

東京農業大学
博 士 論 文

Amphibacillus xylanus の好気代謝系に関する研究

平成 25 年度 修了

農学研究科
バイオサイエンス専攻

望月 大地

東京農業大学
博士論文

Amphibacillus xylanus の
好気代謝系に関する研究

バイオサイエンス専攻

望月 大地

Amphibacillus xylanus の好気代謝系に関する研究

東京農業大学大学院農学研究科
バイオサイエンス専攻
平成 25 年度 博士課程修了

望月 大地

指導教授 新村 洋一

目次	p. 1
略語表	p. 4
緒言	p. 6
第一章 基幹代謝経路の検討	p. 8
序論	
第一節 ゲノム解析	
第一項 代謝経路の推定	
第二節 トランスクリプトーム解析	
第一項 培養、集菌	
第二項 解糖系酵素遺伝子群のノーザン解析	
第三項 RNA-seq 解析	
第三節 小括	
第二章 細胞内遊離フラビンの定量分析	p. 46
序論	
第一節 菌体の酸素吸収能の比較	
第一項 培養、集菌、湿菌体、乾燥菌体の作製	
第二項 酸素吸収の比較	
第二節 フラビン分析法の検討	
第一項 培養、集菌	
第二項 遊離フラビン調製法の検討	
第三項 フラビン分析に最適な破碎法の検討	
第三節 菌体内フラビンの定量分析	
第一項 培養、集菌、湿菌体、乾燥菌体の作製	
第二項 0, 10, 21, 40%酸素濃度条件培養菌体中フラビンの定量分析	
第四節 小括	
第三章 生理的遊離フラビン濃度下で酸素代謝活性を示す酵素の 精製と機能解析	p. 64
第一節 好気条件下の生理的遊離フラビン濃度下で 酸素代謝活性を示す酵素の探索	
第一項 培養、集菌、菌体破碎	

- 第二項 無細胞抽出液画分、可溶性画分、膜画分における
酸素代謝活性の比較
- 第三項 Butyl TOYOPEARL 650S を用いた酵素分画
- 第四項 生理的遊離フラビン濃度下で酸素代謝活性を示す酵素の精製
- 第二節 精製酵素 NPO の発現系の構築と rNPO の精製
 - 第一項 発現系の構築と確認
 - 第二項 rNPO の精製と抗体作製
- 第三節 rNPO の酵素学的諸性質の解析
 - 第一項 至適 pH、温度検討
 - 第二項 基質特異性の検討
 - 第三項 Oxidase 活性生成物の同定
 - 第四項 モル分子吸光係数の算出
 - 第五項 分子量の解析
 - 第六項 FAD 添加、非添加条件での k_m , k_{cat} の算出
 - 第七項 細胞内濃度の測定
- 第四節 NPO の発現解析
 - 第一項 培養、集菌
 - 第二項 ノーザン解析
 - 第三項 ウェスタン解析
- 第五節 小括

第四章 *Amphibacillus xylanus* の NADH oxidase – Prx 系の解析

p.115

- 序論
- 第一節 NADH oxidase の精製
 - 第一項 培養、集菌、発現確認
 - 第二項 精製
- 第二節 Prx の精製
 - 第一項 培養、集菌、発現確認
 - 第二項 精製
- 第三節 NADH oxidase- Prx 複合体分子量測定
 - 第一項 Blue native PAGE による解析
 - 第二項 Static light scattering による解析
 - 第三項 Sedimentation equilibrium による解析
- 第四節 NADH oxidase- Prx 複合体構造解析
 - 第一項 NADH oxidase の結晶構造解析

第二項 Small angle X-ray Scattering による複合体構造解析
第五節 小括

第五章 *Amphibacillus xylanus* の好気代謝経路の検討 p.146

序論

第一節 NADH oxidase- Prx の微生物界における分布の解析

第一項 生化学データからの分布解析

第二項 ゲノムデータを用いた分布解析

第二節 他菌種との比較解析

第一項 系統樹の作製

第二項 シンテニー解析

第三項 他菌種との遺伝子比較解析

総括・展望 p. 177

謝辞 p. 183

参考文献

略語表

略称	正式名称
<i>A. xylanus</i>	<i>Amphibacillus xylanus</i> Ep01 =DSM 6626 ^T =JCM 7361 ^T =NBRC 15112 ^T
炭酸 buffer	NaHCO ₃ -Na ₂ CO ₃ buffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol
Na-pi	NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ buffer(リン酸緩衝液)
K-pi	K H ₂ PO ₄ -K ₂ H PO ₄ buffer
AS	Ammonium sulfate
β-NADH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide,REDUCED FORM
FAD	Flavin adenine dinucleotide disodium salt n-hydrate
FMN	Flavin mononucleotide
R.F.	Riboflavin
PQ	Paraquat
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine
SDS	Sodium dodecylsulfate
IPTG	Isopropyl-β-D(-1)-thiogalactopyranoside
DTT	(±)-Dithiothreitol
2-Me	2-Mercaptoethanol
BPB	Bromophenol blue
CBB	Coomassie brilliant blue
PBS	pH 7.2 , 10mM NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ buffer (150mM NaCl 含有)
DAB	3.3'-Diaminobenzidine
Pharmalyte	Pharmalyte TM 3-10 for IEF
TEA	Triethylamine
Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Prx	Peroxiredoxin
Nox	NADH oxidase
E3	Dihydrolipoamide dehydrogenase
E2	Lipoamide acetyltransferase
E1α	pyruvate dehydrogenase α subunit or pyruvate dehydrogenase complex E1 component α subunit

略称	正式名称
E1 β	pyruvate dehydrogenase β subunit or pyruvate dehydrogenase complex E1 component α subunit
SOD	Superoxide dismutase
Fur	Ferric uptake regulator
PEG	Polyethylene glycol
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
MOPS	3-Morpholinopropane sulfonic acid
sH ₂ O	滅菌水
R.T.	Room Temperature
超純水	Milli-Q 超純水装置システム（日本ミリポア社）によるもの
DLS	Dynamic Light Scattering
GA	Gultalaldehyde

緒言

農産廃棄物のバクテリアを用いた有効利用は、注目される研究分野の一つであるが、実用化には未だ数多くの問題がある。この中でも我々は、効率的かつ低コストバイオマス有効利用系の確立を目指し、バクテリアのスクリーニングを試みた。スクリーニングに際して我々は、農産廃棄物の主要成分として知られるキシランがアルカリ性下で可溶化する性質をもつ点と、好気性嫌気性菌は酸素の供給や除去を行う培養装置が高コストである点の二点に着目した。本スクリーニングの結果、アルカリ性下で生育かつキシラン分解能を有し、酸素の有無にかかわらず生育できる菌を単離した[1]。単離菌の菌学的知見から、新属新種 *Amphibacillus xylanus* (以下、*A. xylanus*)と命名した[2]。

単離当時、アルカリ性菌に関する研究が堀越氏をはじめとして盛んに行われていたが、単離される菌株はアルカリ耐性バチルスが多く、新属新種として本菌は初めて提唱された。本菌が新属新種として提唱されてから現在までに、*A. xylanus* の属する HA グループ[3]に数多くのバクテリアが分類されている。HA グループには好塩、耐塩、好アルカリ、耐アルカリ性菌が多く分類されているが、本菌の生育 NaCl 濃度は 3 - 5 % であり、耐塩性は有していない。

本菌の性質のなかで、酸素の有無にかかわらず生育が可能である点は、低コストバイオマス利用（高価な培養装置が不要な培養）系の確立が期待できるため、我々は *A. xylanus* の好気代謝機構に着目した研究を試みてきた。本菌は呼吸鎖、haem-catalase, peroxidase といった一般的な好気性菌の有する酸素代謝、過酸化水素分解酵素を欠如するにもかかわらず、好気嫌気条件下で良好に生育し、強力な酸素吸収能を有していた[1, 2]。代謝産物、酵素活性、プロテオーム解析により、本菌は好気嫌気条件に対応した 2 ピルビン酸代謝経路を有しており、好気条件下では PDH complex、SOD、NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx)、flavin synthetic pathway が重要であることが推定されている[4, 5]。しかしながら、これまでの解析は局所的な解析に留まっており、強力な酸素吸収を可能にする機構を始めとして、*A. xylanus* 好気代謝系の全容は未解明であった。そこで本研究ではゲノム解析、トランスクリプトーム解析と生化学的な解析を併せて、*A. xylanus* の好気代謝経路の全容解明を目的とした。

前任者である新井らは、独立行政法人製品技術評価機構（NITE）との共同研究により全ゲノム配列解読と全遺伝子のマニュアルアノテーションを行い、*A. xylanus* ゲノム情報データベースを完成させた。そこで私は、まずゲノムデータを利用した基礎代謝経路遺伝子の同定を試みた。第一章ではゲノム解析とトランスクリプトーム解析を中心として、基幹代謝経路関与遺伝子の転写レベルでの存在を検討し *A. xylanus* の

有する基幹代謝経路の存在を検討した。加えて、トランスクリプトーム解析により既知酸素代謝酵素遺伝子である *nox1*, *prx*, *sodA* 以外に酸素代謝に関与し得る酵素があるのか特定を試みた。第二、三章では、好気条件下でのキーエンザイムとされる Nox がタンパク質非結合型フラビン (遊離のフラビン) 存在下で酸素に対する親和性が著しく上昇することから、細胞内遊離フラビンの存在と遊離フラビンが関与する酸素代謝経路の存在について検討した。第四章では、本菌の酸素代謝におけるキーエンザイムである Nox-Prx 複合体の分子量と構造を解析した。五章では Nox-Prx 系のバクテリア界における分布と近縁種との遺伝子比較解析により *A. xyloxylium* の有する好気代謝系の一般性について考察した。以上の解析より、*A. xyloxylium* の有する好気代謝経路について考察する。

第一章 基幹代謝経路の検討

序論

A. xylophilus の好気代謝経路の解明を目的として、これまでに代謝産物分析、酵素活性、プロテオーム解析、ゲノム解析が行われ、*A. xylophilus* の代謝経路の推定が行われた。これまでに推定された代謝経路を Figure 1-0-1 に示す。これまでの解析により、*A. xylophilus* の好気代謝には PDH complex による NADH (還元力) の供給と、SOD, Nox-Prx による酸素代謝が重要であることが推定され、また解糖系に関与する酵素のゲノムレベルでの存在が推定されている。解糖系をはじめとする代謝酵素遺伝子はゲノムレベルでの存在の推定に留まっていることから、本章では、利用可能なゲノムデータから糖代謝以外の代謝経路 (アミノ酸合成、脂肪酸代謝、核酸代謝) と酸素代謝酵素遺伝子同定を試み、これらゲノムレベルで存在が示された解糖系を含む代謝酵素遺伝子群の転写レベルでの存在を検討した。トランスクリプトーム解析では全遺伝子の転写挙動を解析できることから、既知の酸素代謝に関与する酵素遺伝子の転写挙動をコントロールとして、これ以外に酸素代謝に関与し得る酵素のスクリーニングを行った。

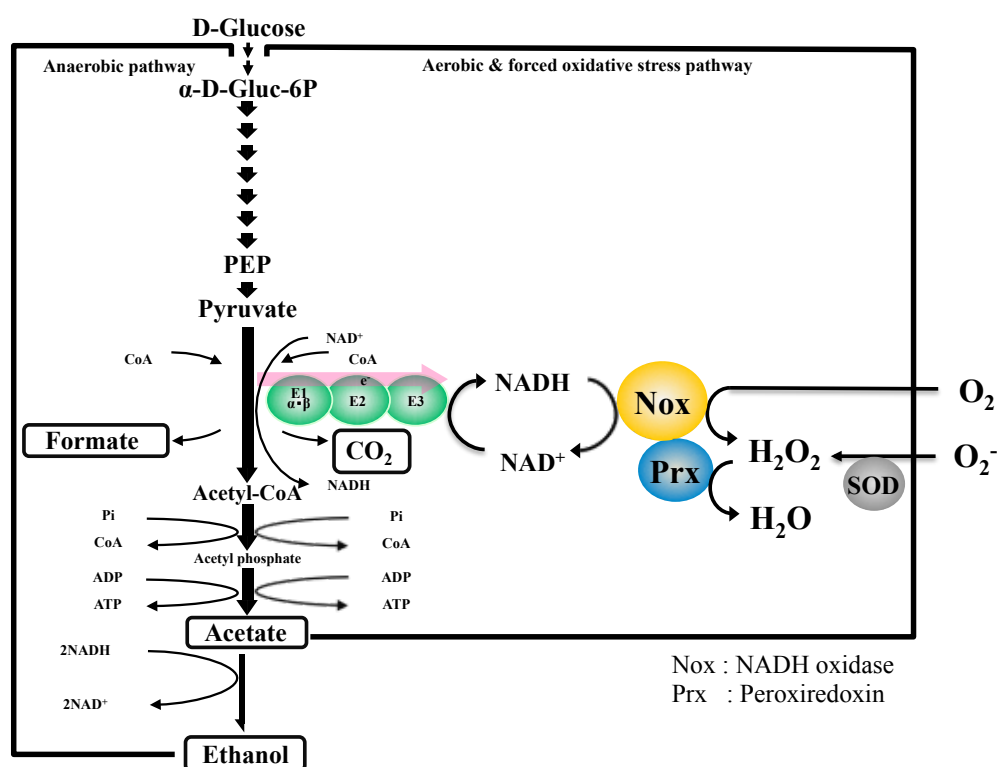


Figure 1-0-1. Previous metabolic pathway of *Amphibacillus xylophilus*.

第一節 ゲノム解析

ゲノム解析手法（シーケンス、アッセンブリ、ORF の決定、マニユアルアノテーション）の詳細については前任者である新井、笹倉の博士、修士論文を参照する[4, 6]。

第一項 基幹代謝経路の検討

1. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を利用した代謝経路の推定

代謝経路の推定には KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)を利用した。*A. xyloxylophilus* ゲノムデータは一般的なデータバンク (DDBJ, GenBank) に登録済みであり、KEGG web site においてもデータ利用可能である。KEGG 内で使用されている pathway カテゴリーに基づき、代謝経路を一つずつ目視で確認し、代謝経路の有無を評価した。KEGG を用いて *A. xyloxylophilus* 全ゲノムデータをマッピングした代謝経路の全体像を Figure 1-1-1 に示す。

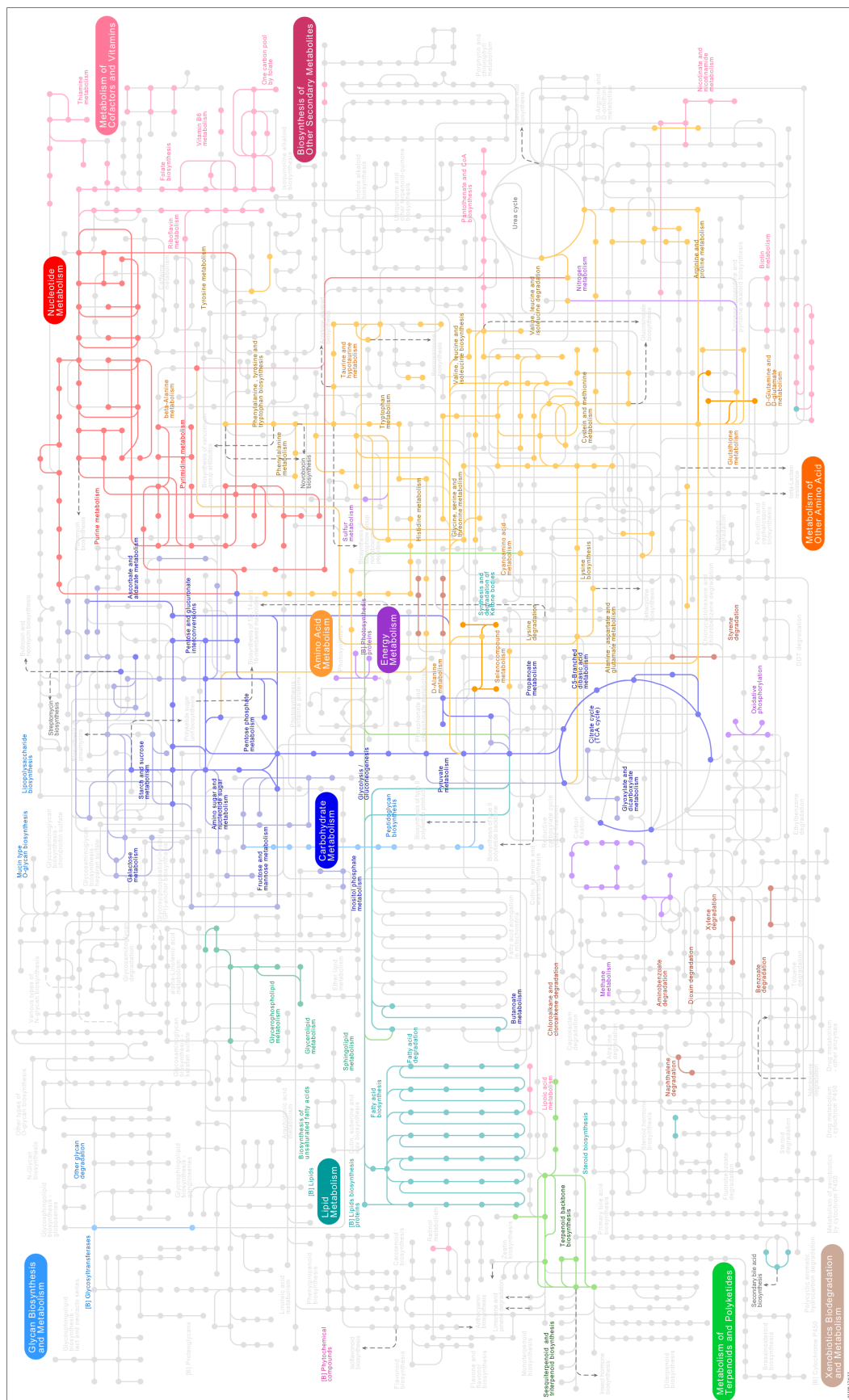


Figure 1-1-1. *Amphibacillus xylophilus* のゲノムデータベースを基に作製したグローバル代謝マップ。着色箇所が *A. xylophilus* の有する代謝経路を示す。

2. Fatty acid metabolism

A. xylanus は Fatty acid bio synthesis を有していた (Figure 1-1-2)が、fatty acid degradation は欠如していた (Figure 1-1-3)。

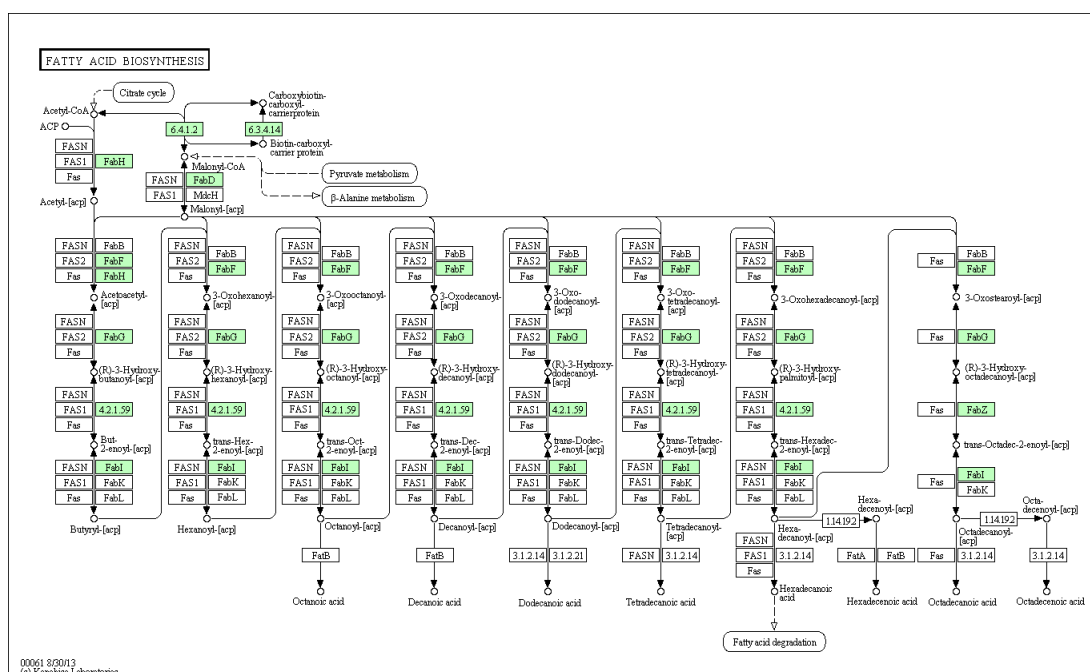


Figure 1-1-2. Fatty acid biosynthesis in *Amphibacillus xylanus* base on KEGG

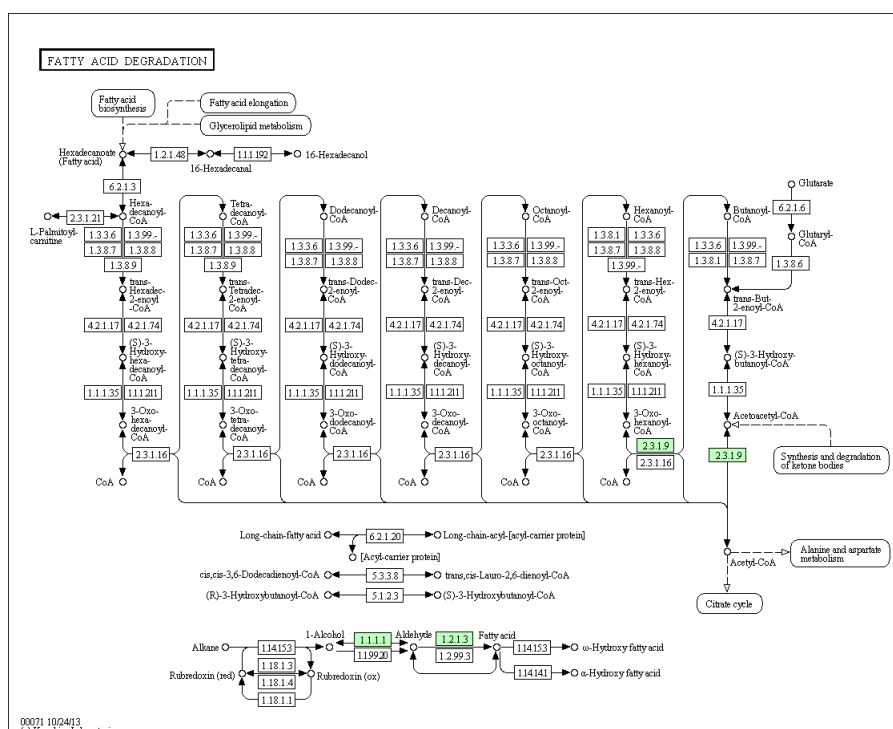


Figure 1-1-3. Fatty acid degradation in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

3. Nucleotide metabolism

A. xylanus は核酸構成要素であるアデニン (Figure 1-1-4)、グアニン (Figure 1-1-4)、シトシン (Figure 1-1-5)、チミン (Figure 1-1-5) 合成経路を有した。

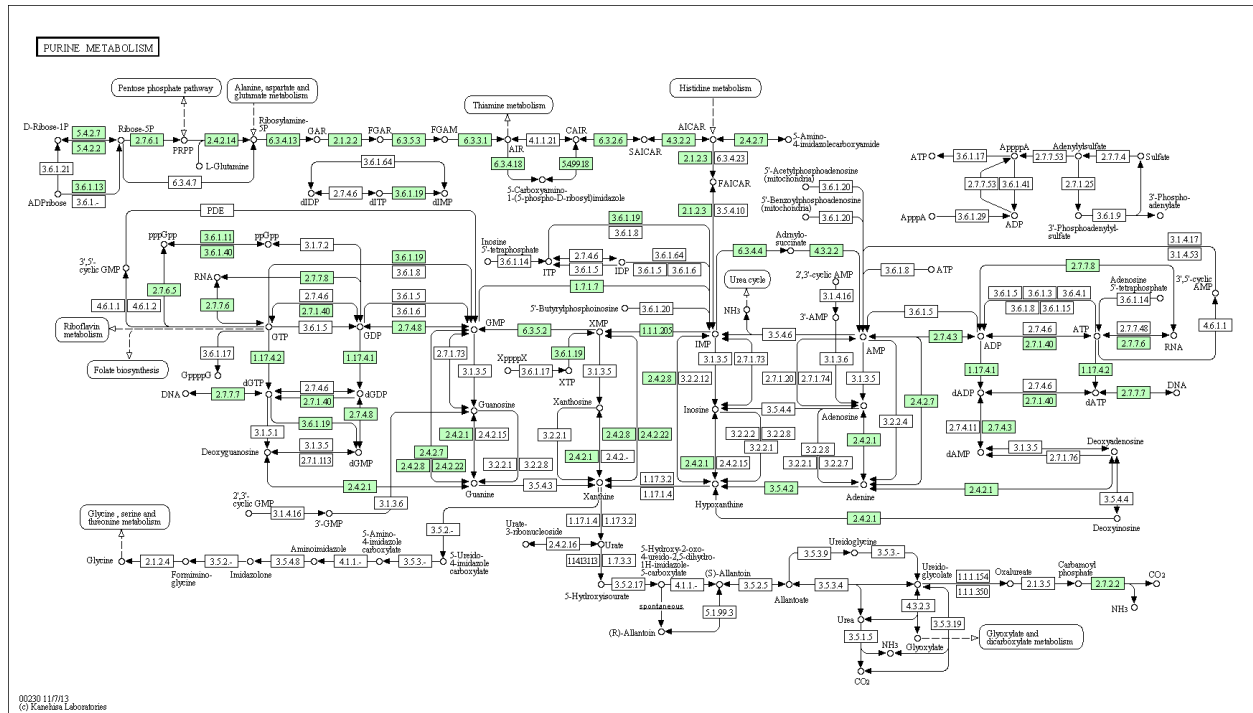
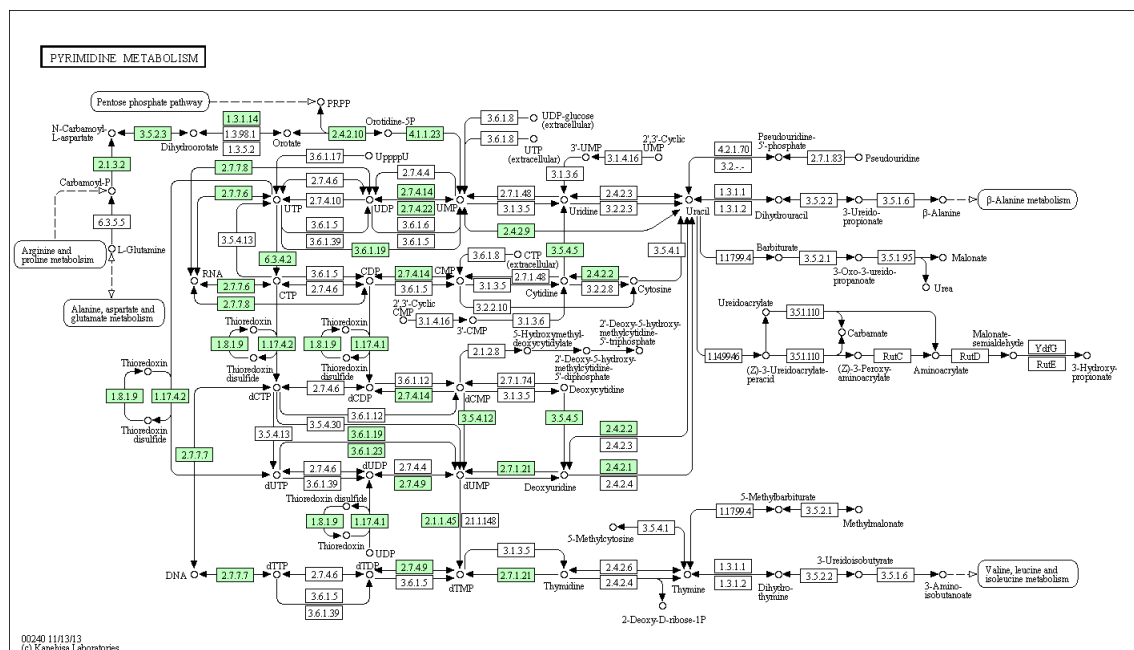


Figure 1-1-4. Purine metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.



4. Amino acid metabolism

A. xylophilus は Arginine, proline, Glutamine, glutamate をのぞくアミノ酸合成経路を有していた。Alanine, aspartate, glutamate, glutamine 代謝を Figure 1-1-6 に Glycine, serine, threonine, tryptophan 代謝を Figure 1-1-7 に、cysteine methionine 代謝を Figure 1-1-8 に、valine, leucine, isoleucine 代謝を Figure 1-1-9 に、lysine 代謝を Figure 1-1-10 に、arginine, proline 代謝を Figure 1-1-11 に histidine 代謝を Figure 1-1-12 に、phenylalanine, tyrosine, tryptophan 代謝を Figure 1-1-13 に示す。

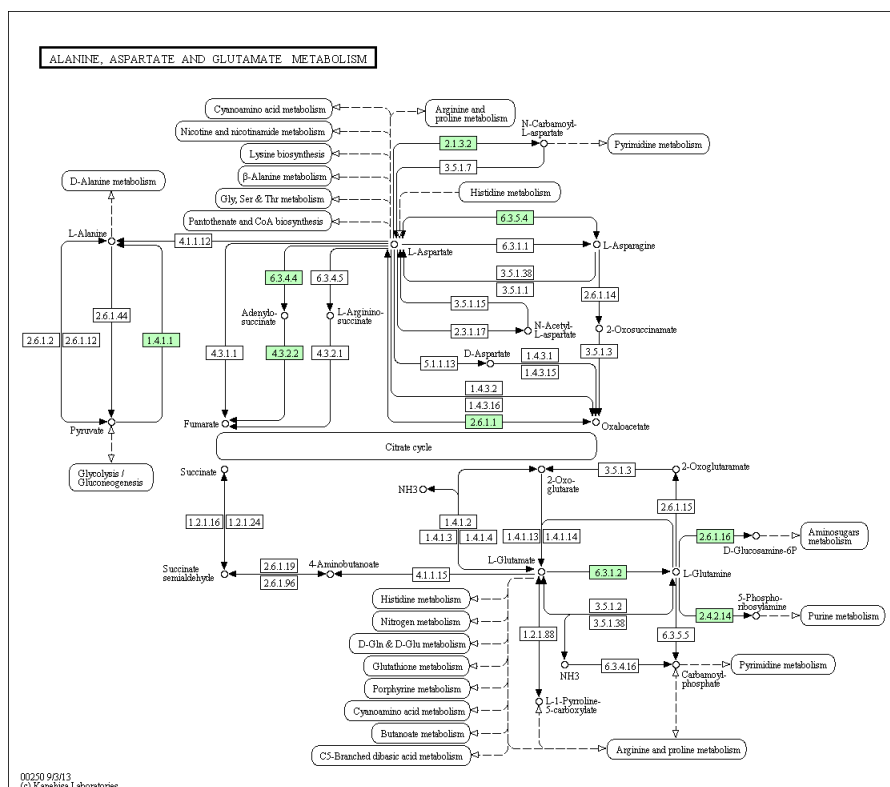


Figure 1-1-6. Alanine, aspartate and glutamate metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

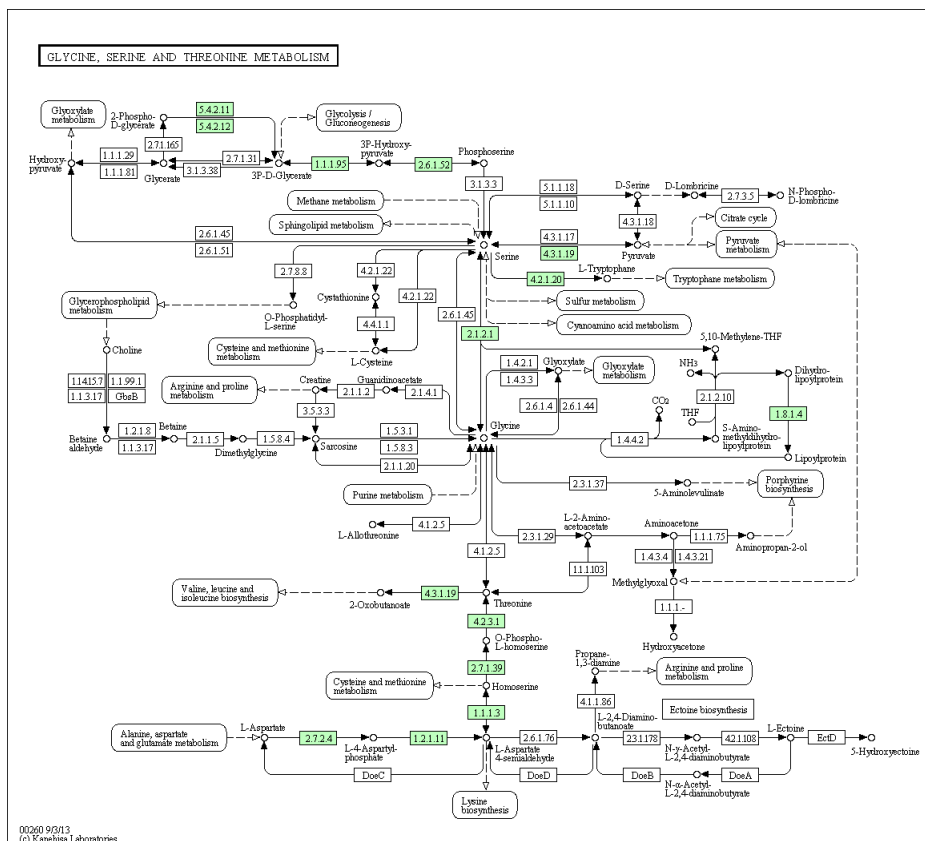


Figure 1-1-7. Glycine, Serine and threonine metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG

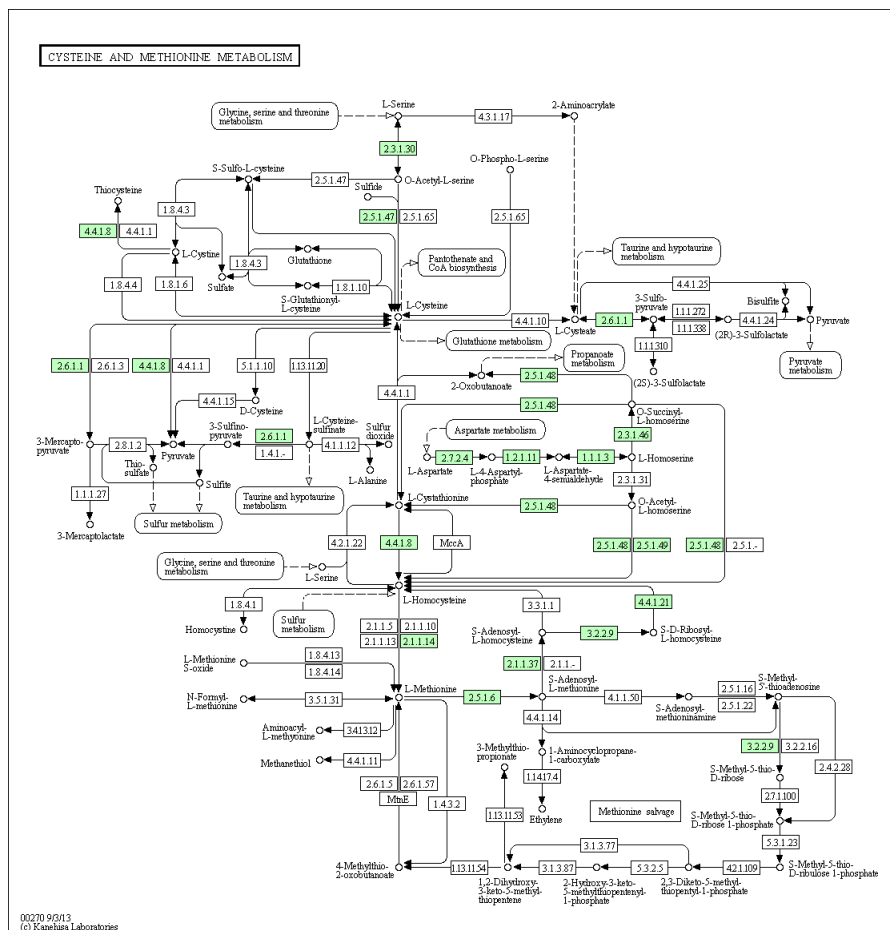


Figure 1-1-8. Cysteine and methionine metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

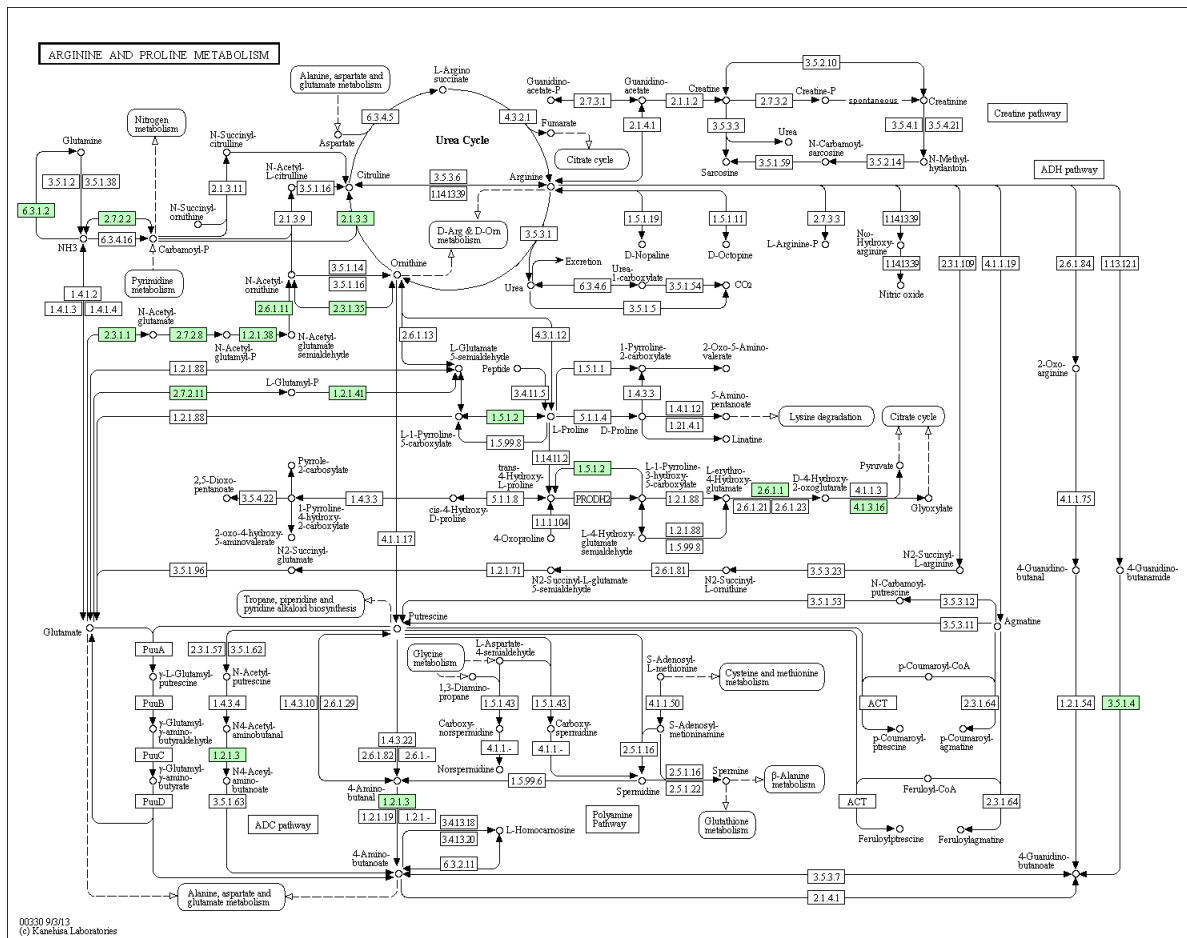


Figure 1-1-11. Arginine and proline metabolic pathway in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

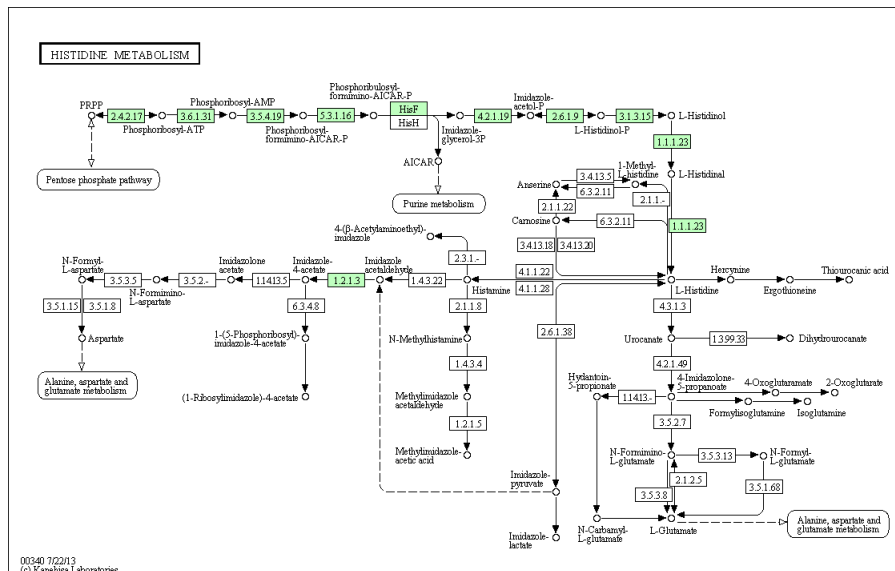


Figure 1-1-12. Histidine metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

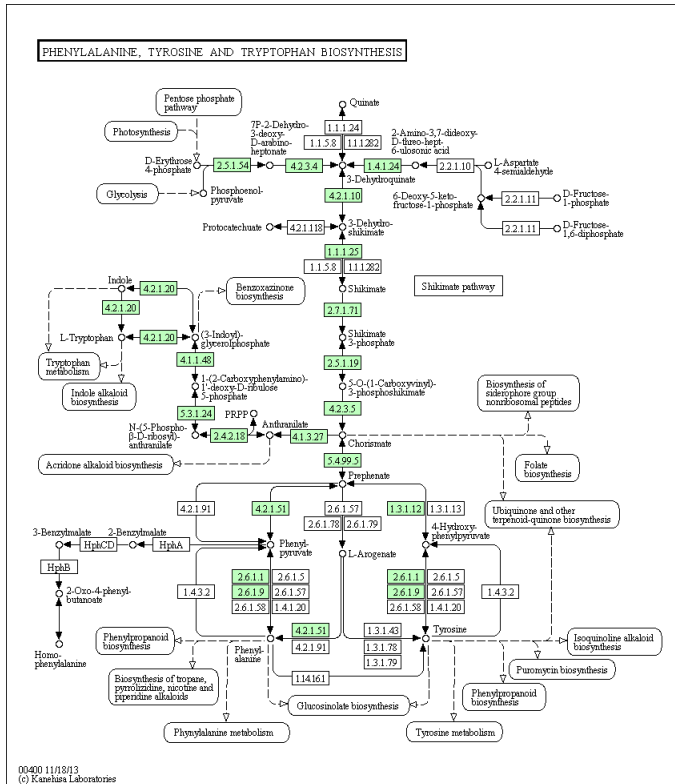


Figure 1-1-13. Histidine metabolism in *Amphibacillus xylanus* based on KEGG.

第二節 トランスクリプトーム解析

第一項 培養、集菌

1. GY 培地の作製

以下の試薬を調製する。特に記載のない場合は和光純薬工業製の特急試薬を用いた。

【 Glucose solution 】

D-glucose 25 %

作製後 115℃, 10min オートクレーブ

【 Resazurin solution 】

Resazurin sodium salt (Wako 一級) 0.1 %

【 炭酸 buffer 】

NaHCO₃ 1 M

Na₂CO₃ 1 M

NaHCO₃ : Na₂CO₃ をあわせ、pH 10.6 に調整し、121 °C, 20 min オートクレーブ。

【 Salt B solution (× 100) 】

MgSO₄ · 7H₂O 2.0 %

MnSO₄ · 5H₂O 0.05 %

FeSO₄ · 7H₂O 0.05 %

【 Salt C solution (× 100) 】

CaCl₂ · 2H₂O 1 %

GY 培地組成を Table 1-2-1 に示す。グルコースと炭酸バッファー、Resazurin 溶液をのぞいたすべての試薬を混合し pH を 7.0 に調整する。pH 調整後に Resazurin 溶液を加え、121℃, 20min オートクレーブする。植菌直前に Glucose solution と炭酸 buffer を添加する。

Table 1-2-1. Compositions of GY medium

Regent	Percentage (%)	g / ℓ
Yeast extract (DIFCO)	0.30	3
Polypepton (日本製薬)	0.03	0.3
NH ₄ NO ₃	0.20	2
K ₂ HPO ₄	0.10	1
×100 Salt B solution	1.00	10
×100 Salt C solution	1.00	10
Resazurin 溶液	0.10	1
Glucose solution	4.00	40
炭酸 buffer	5.00	50

2. 嫌気培養、集菌

胞子状態で低温保存してある *A. xylanus* を 10 ml の嫌気 GY 培地に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 120 ml バイアル、3 ℓ / 10 ℓ ジャーファメンター とスケールアップし培養を行った。3 ℓ 培養には嫌気条件 (N₂ 吹き込み) で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 100 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 0.5 付近で培養液 50 ml を採取し 100,000 rpm 1 min 4 °C (TOMMY MX-305) で素早く集菌した。集菌菌体は素早く液体窒素にて凍結させ -80°C で保存した。ジャーファメンターを用いた 3 ℓ 培養時の詳細な条件は Table 1-2-2 に示す。生育曲線を Figure 1-2-1A に示す。

3. 好気培養、集菌

胞子状態で低温保存してある *A. xylanus* を 10 ml の嫌気 GY 培地に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml バッフル付き三角フラスコ、3 ℓ / 10 ℓ ジャーファメンター とスケールアップし培養を行った。3 ℓ 培養では好気条件 (Air 吹き込み) で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 100 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 0.5 付近で培養液 50 ml を採取し 100,000 rpm 1 min 4 °C (TOMMY MX-305) で素早く集菌した。集菌菌体は素早く液体窒素にて凍結させ -80°C で保存した。ジャーファメンターを用いた 3 ℓ 培養時の詳細な条件は Table 1-2-1A に示す。生育曲線を Figure 1-2-1A に示す。

4. 途中酸素添加培養、集菌

3 ℓ 培養までの行程は嫌気培養に順じて行う。O.D.₆₆₀ ≒ 0.5 付近で Air を添加

し、0, 5, 10, 30 min 時に 培養液 50 ml を採取し 100,000 rpm 1 min 4 °C (TOMMY MX-305) で素早く集菌した。集菌菌体は素早く液体窒素にて凍結させ-80°Cで保存した。ジャーファメンターを用いた 30 培養時の詳細な条件は Table 1-2-2 に示す。生育曲線を Figure 1-2-1B に示す。

Table 1-2-2. Detailed culture conditions.

	O ₂ conc. (%)	
	0	21
Instrument	Jarfermenter	Jarfermenter
Company	MARUBISHI	MARUBISHI
Type	MDL-1001S	MDL-1001S
Scale (L)	10	10
Medium volume (L)	3	3
Gass	N ₂ gass	air
Agitation (rpm)	50	100
Airation (v/v/m)	0.5	0.5
Culture condition		
Temp.	39.5	39.5
pH	9.75	9.75

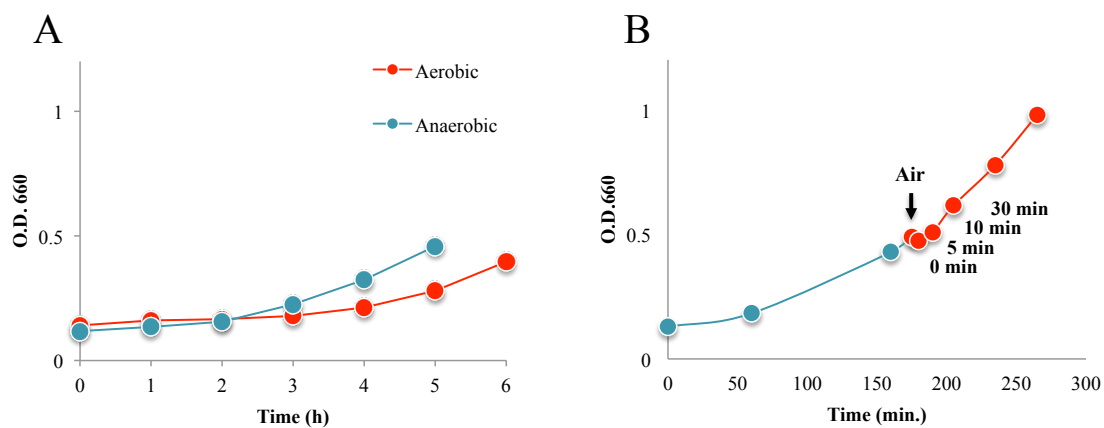


Figure 1-2-1. Growth curve of *Amphibacillus xylanus* under aerobic and anaerobic conditions (A), and under air addition to anaerobic conditions (B)

第二項 ノーザン解析

1. Total RNA の抽出

同章 第2節 第1項にて集菌、凍結した菌体を TRIzol を用いて total RNA を抽出する。手法は[6, 7]を参照する。

2. メンブレンの作製

Total RNA を 12 ng / lane となるように泳動しメンブレンへブロッティングした。手法は[6, 7]を参照する。

3. プローブの作製

Primer 3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)にてプライマーを作製し、各解糖系酵素遺伝子に対応したプローブを作製した。プローブの配列は笹倉修士論文を参照する[6]。

4. ハイブリダイズ

プローブへの核種取り込みには Prime-It[®] II Random Primer Labeling Kit (Agilent Technologies 社) を用い、ハイブリダイズは 65°C オーバーナイトで行った。手法は[6]を参照する。

5. イメージング

ハイブリダイズの終わったメンブレンのイメージングには IP プレートと BAS を用いた。画像解析にはを用いた。

6. 結果

ノーザン解析に供した解糖系酵素遺伝子群のバンドが検出され、ゲノム解析により推定した解糖系代謝経路関与遺伝子の転写を確証した (Figure 1-2-2)。酸素代謝への関与報告のある遺伝子群のなかでも *fer*, *fdxA*, *trxA*, *trxB*, *yumC* は酸素による転写誘導が観察された。

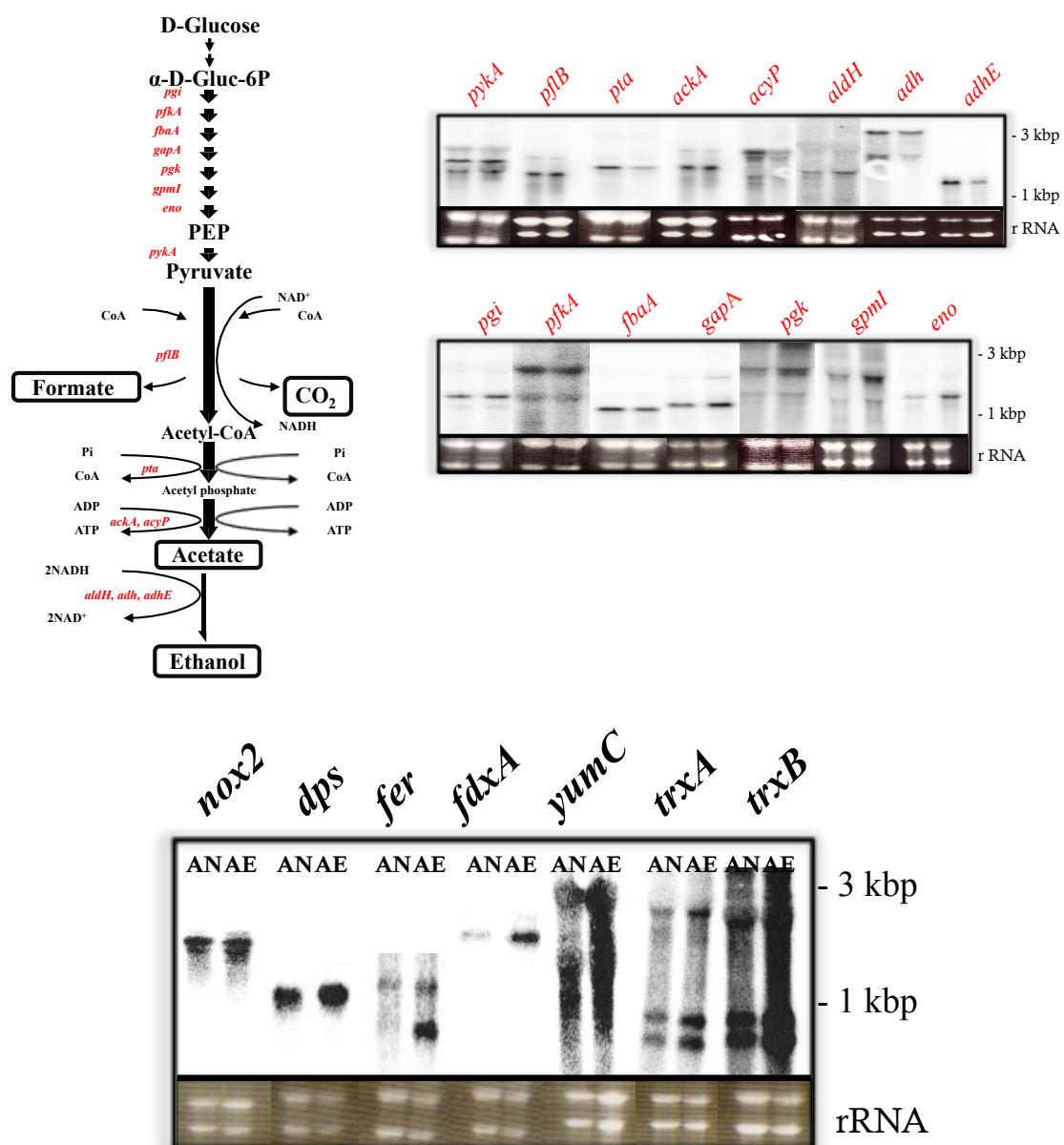


Figure 1-2-2. Northern analysis of the genes related to Glycolytic pathway and oxygen metabolism in *Amphibacillus xylanus*.

第三項 RNA-seq 解析

1. Total RNA の抽出

第一章 第二節 第二項 1 に準じて、total RNA の抽出を行った。

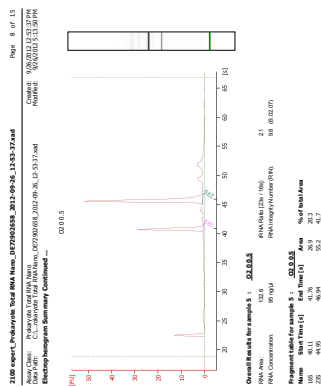
2. RNA Integrity Number (RIN) の測定

本実験は東京農業大学 ゲノム解析センター（12 号館 6 階）にて行った。調整した RNA サンプルの濃度を適時調製し、バイオアナライザ（Agilent 社）にて RIN を測定する。RIN は RNA の分解度をチェックする指標となる数値で、RNA-seq には一般に $RIN \geq 8.0$ のものを用いる。詳細は RIN 参照サイト

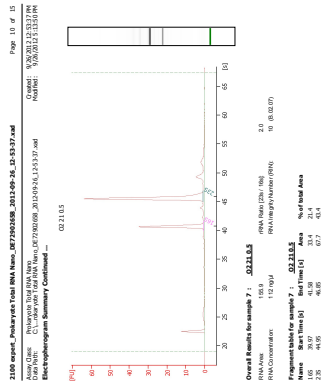
(http://www.chem-agilent.com/cimg/RIN_chirashi_final_Hi.pdf) と [8, 9] を参照する。測定プロトコールはアジレント社 HP

(<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1000423>) を参照する。バイオアナライザの測定より、使用した total RNA サンプルの RIN はすべて 8.0 以上であった (Figure 1-2-3)。

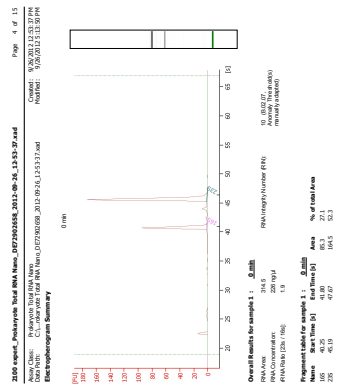
A



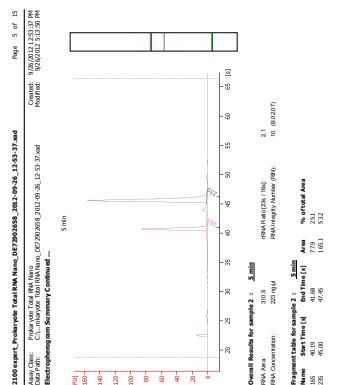
B



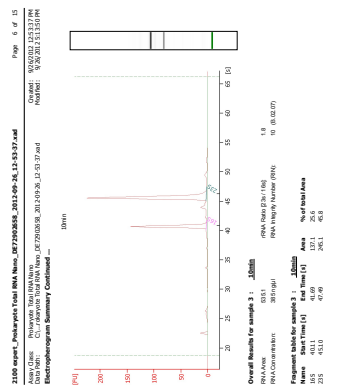
C



D



E



F

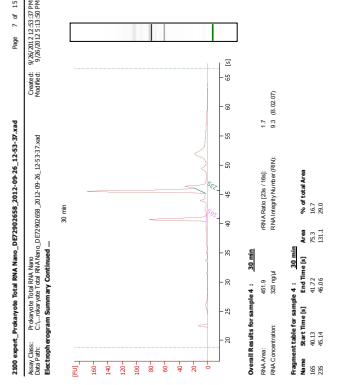


Figure 1-2-3. RIN of total RNA samples eluted from *Amphibacillus xylanus* cultured under various conditions. A: O₂ 0 %, B: O₂ 21 %, C: 0 min after oxygen addition, D: 5 min after oxygen addition, E: 10 min after oxygen addition, F: 30 min after oxygen addition.

3. rRNA の除去

Total RNA からの rRNA の除去は Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits Gram-Positive Bacteria (epicentre 社) を用いた。手法は [http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/ribo-zero-magnetic-kit-\(gram-positive-bacteria\).pdf](http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/ribo-zero-magnetic-kit-(gram-positive-bacteria).pdf) を参照する。rRNA 除去後にバイオアナライザにより rRNA 除去を確認した。除去後のサンプルからは rRNA のピークが減少しており、rRNA の除去を観察した (Figure 1-2-4)。



4. Sequence library の作製

シーケンスライブラリーの作製にはNEBNext® mRNA Library Prep Master Mix Set for Illumina®を用いた。手法は

<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/9CAE5A56D3EB419991119FC6D3B21158/Datacards%20or%20Manuals/manualE6110.pdf> を参照する。簡潔に

rRNA を除去したサンプルを断片化し、1 本鎖 cDNA を合成する。一本差 cDNA より二本鎖の DNA library を合成し、アダプター付加、index 付加、遺伝子断片の増幅行程を経て、sequence library が完成する。最終的な sequence library 収量を Table 1-2-3 に示す。

Table 1-2-3. Yeild summary of samples for RNA-seq.

Samples	Units	Oxygen addition (min)				Oxygen conc. (%)	
		0	5	10	30	0	21
RIN		10	10	10	9.3	9.8	10
Stoc conc.	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Total μg	5	5	5	5	5	5
After rRNA	$\text{ng}/\mu\text{l}$	ND	22.06	14.82	18.82	10.07	16.49
elimination	Total ng	ND	397.08	266.76	338.76	181.26	296.82
After	$\text{ng}/\mu\text{l}$	1.29	3.38	4.29	13.02	6.26	4.42
fragmentation	Total ng	19.35	50.7	64.35	195.30	93.90	66.30
Final	$\text{ng}/\mu\text{l}$	6.69	22.30	12.00	27.29	6.01	17.78
conc.	Total ng	33	111.5	62.6	141.20	31.40	90.60

5. シーケンス

作製した **sequence library** を次世代シーケンサー (Hi-seq illumina 社) によりシーケンスを行った。Sample は各 10 ng となるように調製し、東京農業大学 12 号館 6 階生物資源ゲノム解析センターに依頼し、シーケンスを行って頂いた。

6. データ解析

シーケンスデータの解析には **Genomics work bench ver. 6.01** (CLC bio 社) を用いた。シーケンスデータの取り込み、トリミング後に *A. xylophilus* ゲノムに対してリードのマッピングを行った。各サンプルのマッピングレポートを Table 1-2-4. に示す。**Genomics work bench ver.6.01** の使用方法は解析マニュアルに従って行った。

7. 全遺伝子発現パターンに基づいたクラスタリング解析

得られた解析データを基に **Genomics work bench ver. 6.01** を用いて全遺伝子の転写パターンのクラスタリング解析を試みた。クラスタリングには **Euclidean distance** と **Average linkage** を用いていた。

Table 1-2-4. Mapping report of every samples.

		Oxygen conc. (%)			Oxygen addition (min)			
		0	21	40	0	5	10	30
Sequence reads	Number of reads	44276	37626	37265	57410		57133	53924
		304	218	606	154		058	566
	Longest read	100	100	100	100	100	100	100
	paired	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Mapping statistics								
Fragment counting (show Paired only)	Counted fragments	34143	31227	29390	38250	36091	44108	42430
		487	570	743	385	62	633	763
	- uniquely	34143	31227	29390	38250	36091	44108	42430
		487	570	743	385	62	633	763
	- non-specifically	0	0	0	0	0	0	0
	Uncounted fragments	10132	63986	78748	19159	15283	13024	11493
		817	48	63	769	578	425	803
	Total fragments	44276	37626	37265	57410	51375	57133	53924
		304	218	606	154	198	058	566
	Maped rate (%)	77.1	83.0	78.9	66.6	70.3	77.2	78.7
Paired reads	Reads mapped in pairs	66206	73635	87777	73946	89004	73326	76958
		66	54	64	98	42	26	50
	Reads mapped in broken pairs	27522	23864	20612	30855	27191	36776	34734
		821	016	979	687	178	007	913
	Reads not mapped	10132	63986	78748	19159	15283	13024	11493
		817	48	63	769	578	425	803
	Total	44276	37626	37265	57410	51375	57133	53924
		304	218	606	154	198	058	566

8. 結果

ゲノム解析にて同定した代謝経路関与遺伝子は、すべて RNA-seq 解析において Unique gene reads が検出された。これより、ゲノムレベルで推定した代謝経路（解糖系、核酸代謝、脂肪酸合成、アミノ酸代謝）の存在が転写レベルで確認された。各遺伝子の Unique gene reads と Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM)のまとめを Table 1-2-5 に示す。RPKM は遺伝子発現量の指標の一つであり、後述の URL を参照する (http://www.w-fusion.com/J/clc_bio/pdf/R_Q1.pdf)。この値は一般に遺伝子間の発現量を比較することが可能であるとされているが、今回の実験の実験回数が 1 回であることを考慮して RNA-seq 解析の結果のみで転写誘導を言及することは難しいと判断した。そこで *A. xyloxydans* においてタンパク質発現 (2D)、転写 (ノーザン解析)の酸素による誘導が明らかにされている遺伝子群を指標として、RNA-seq 解析結果を基に、全遺伝子のクラスター解析を行った。興味深いことに *nox1*, *prx*, *pdhBCD* は近接するクラスターを形成した。しかし、*nox1*, *prx*, *pdh operon* が属するクラスターに酸素代謝への関与が報告されている遺伝子は存在しなかった (Figure 1-2-5)。

Table 1-2-5. Unique gene reads and RPKM of the metabolisc pathways.

Path.	ID(AXY_)	name	Product	EC number	Unique gene reads		RPKM	
					0%	21%	0%	21%
Glycolytic pathway								
	13380	ilvE	branched-chain amino acid aminotransferase	EC:2.6.1.42	28023	33367	762.1	992.1
			branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component subunit					
	11870	bkdA	alpha	EC:1.2.4.4	62955	28696	1845.7	919.9
			branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component subunit					
	11880	bkdB	beta	EC:1.2.4.4	73048	35470	2167.6	1150.8
	11890	bkdC	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit	EC:2.3.1.168	117244	50475	2764.8	1301.4
	16170	pdhD	pyruvate dehydrogenase complex E3 component	EC:1.8.1.4	26319	123297	547.9	2806.2
	11860	bkdD	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E3 subunit	EC:1.8.1.4	62358	35486	1279.0	795.8
	2850	aldH	aldehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.3	1253	1140	27.0	26.9
	13160	AXY_13160	acetyl-CoA acetyltransferaseK00626 acetyl-CoA C-acetyltransferase	EC:2.3.1.9	21925	29148	544.7	791.7
	13150	mvaS	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	EC:2.3.3.10	22238	24011	553.8	653.8
Cytrate cycle								
	9350	citZ	citrate synthase	EC:2.3.3.1	10102	13575	265.1	389.5
	13600	citB	aconitate hydratase	EC:4.2.1.3	58145	79716	631.4	946.5
	9360	citC	isocitrate dehydrogenase	EC:1.1.1.42	52062	52494	1198.7	1321.6
	11860	bkdD	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E3 subunit	EC:1.8.1.4	62358	35486	1279.0	795.8
	18470	fumC	fumarate hydratase class II	EC:4.2.1.2	1368	2186	28.9	50.5
Pentose phosphate pathway								
	8540	pgi	glucose-6-phosphate isomerase	EC:5.3.1.9	336305	225296	7312.4	5356.1
	5930	zwf	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	EC:1.1.1.49	19293	27203	383.6	591.4
	16530	pgl	6-phosphogluconolactonase	EC:3.1.1.31	26817	30925	748.0	943.2
	5910	gnd	6-phosphogluconate dehydrogenase	EC:1.1.1.44	58232	59400	1201.9	1340.5
	15410	rpe	ribulose-5-phosphate 3-epimerase	EC:5.1.3.1	9198	12603	404.5	606.0
	13640	tkt	transketolase	EC:2.2.1.1	67287	68150	986.3	1092.3
	20520	rpiB	ribose-5-phosphate isomerase B	EC:5.3.1.6	10581	16976	693.3	1216.2
	2600	deoC	deoxyribose-phosphate aldolase	EC:4.1.2.4	3863	4885	173.8	240.3
	19560	rbsK	ribokinase	EC:2.7.1.15	13243	11339	445.8	417.4
	2570	deoB	phosphopentomutase	EC:5.4.2.7	6212	7503	153.5	202.8
	19330	pgm	phosphoglucomutase	EC:5.4.2.2	295844	268349	4979.7	4938.7
	540	prs	ribose-phosphate pyrophosphokinase	EC:2.7.6.1	107546	86330		

2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase/2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate							
2750	kdgA	aldolase	EC:4.1.3.16 4.1.2.14	489	1340	22.5	67.5
2760	kdgK	2-keto-3-deoxygluconate kinase	EC:2.7.1.45	591	1287	17.8	42.3
20650	fbaA	fructose-bisphosphate aldolase	EC:4.1.2.13	320802	370318	10989.1	13869.8
19490	pfkA	6-phosphofructokinase	EC:2.7.1.11	51887	46769		
9300	pfkA	6-phosphofructokinase	EC:2.7.1.11	50844	44458		
Fatty acid metabolism							
9290	accA	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	EC:6.4.1.2	22621	16358	698.9	552.6
11710	accB	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein		13808	20046	847.8	1345.8
11720	accC	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	EC:6.3.4.14 6.4.1.2	73166	71849	1576.8	1693.0
9280	accD	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit beta	EC:6.4.1.2	21788	16091	736.0	594.3
15330	fabD	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	EC:2.3.1.39	54481	32936	1704.8	1126.8
18030	fabF	3-oxoacyl-ACP synthase	EC:2.3.1.179	75395	39650	1777.9	1022.3
18040	fabH	3-oxoacyl-ACP synthase	EC:2.3.1.180	18663	25066	585.9	860.3
15320	fabG	3-oxoacyl-ACP reductase	EC:1.1.1.100	61366	33530	2406.0	1437.4
20360	fabZ	beta-hydroxyacyl-	KO:K02372	12628	12168	880.6	927.8
17770	fabI	enoyl-(acyl carrier protein) reductase	EC:1.3.1.10 1.3.1.9	68171	43243	2559.7	1775.3
Prine metabolism							
11970	nudF	ADP-ribose pyrophosphatase	EC:3.6.1.13	2969	2718	160.1	160.3
2570	deoB	phosphopentomutase	EC:5.4.2.7	6212	7503	153.5	202.8
19330	pgm	phosphoglucomutase	EC:5.4.2.2	295844	268349	4979.7	4938.7
540	prs	ribose-phosphate pyrophosphokinase	EC:2.7.6.1	107546	86330		
4330	purF	amidophosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.14	21046	111201	433.5	2504.2
4370	purD	phosphoribosylamine-glycine ligase	EC:6.3.4.13	31036	120185	726.6	3076.5
4350	purN	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	EC:2.1.2.2	10409	58958	515.8	3194.6
4300	purS	phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	EC:6.3.5.3	3735	20424	434.1	2595.4
4310	purQ	phosphoribosylformylglycinamide synthase I	EC:6.3.5.3	10901	56718	470.9	2678.9
4320	purL	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	EC:6.3.5.3	49685	235042	652.8	3376.7
4340	purM	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	EC:6.3.3.1	17047	100506	485.2	3127.8
4270	purK	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	EC:6.3.4.18	15273	80868	398.7	2308.1
4260	purE	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	EC:5.4.99.18	3261	18653	194.1	1214.1

4290	purC	phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthase	EC:6.3.2.6	24452	64918	1007.2	2923.9
4280	purB	adenylosuccinate lyase	EC:4.3.2.2	45117	185283	1019.6	4578.2
		phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP					
4360	purH	cyclohydrolase	EC:3.5.4.10 2.1.2.3	31089	154611	595.1	3236.0
10480	apt	adenine phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.7	17958	18300	1019.3	1135.7
2580	punA	purine nucleoside phosphorylase	EC:2.4.2.1	4914	6365	176.4	249.8
8500	deoD	purine nucleoside phosphorylase	EC:2.4.2.1	9098	10321	370.1	459.0
810	hprT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.8	9414	16585	507.8	978.1
90	guaB	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	EC:1.1.1.205	100911	40468	2006.4	879.8
3960	xpt	xanthine phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.22	1711	31631	86.5	1749.4
3930	guaA	GMP synthase	EC:6.3.5.2	15950	48060	304.1	1002.0
17100	guaC	GMP reductase	EC:1.7.1.7	13784	189491	411.5	6185.6
15500	gmK	guanylate kinase	EC:2.7.4.8	10868	14525	512.6	749.0
9310	pykA	pyruvate kinase	EC:2.7.1.40	214773	193132	3565.9	3506.0
13080	nrdE	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	EC:1.17.4.1	37613	110370	501.6	1609.5
13090	nrdF	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	EC:1.17.4.1	20943	64288	608.5	2042.4
23180	nrdD	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	EC:1.17.4.2	24498	8086	329.4	118.9
1500	rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	EC:2.7.7.6	68257	88002	2115.5	2982.1
1150	rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	EC:2.7.7.6	163078	126583	1351.5	1147.0
1160	rpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	EC:2.7.7.6	151814	140721	1225.9	1242.4
20680	rpoE	DNA-directed RNA polymerase subunit delta		20907	22550	1091.5	1287.2
15490	rpoZ	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	EC:2.7.7.6	5691	6512	782.5	979.0
9390	polA	DNA polymerase I	EC:2.7.7.7	23947	23788	265.4	288.2
9260	dnaE	DNA polymerase III subunit alpha	EC:2.7.7.7	14633	13059	129.5	126.4
14630	polC	DNA polymerase III PolC-type	EC:2.7.7.7	50817	41364	347.2	309.0
20	dnaN	DNA polymerase III subunit beta	EC:2.7.7.7	18769	37636	480.9	1054.4
190	dnaX	DNA polymerase III subunit tau	EC:2.7.7.7	16929	17658	292.5	333.6
10910	holA	DNA polymerase III subunit delta	EC:2.7.7.7	2895	3492	82.9	109.3
330	holB	DNA polymerase III subunit delta'	EC:2.7.7.7	8097	9619	240.3	312.1
10490	relA	GTP pyrophosphokinase	EC:2.7.6.5	30483	20050	407.7	293.2
23840	purA	adenylosuccinate synthetase	EC:6.3.4.4	21107	155122	478.1	3841.8
21320	ade	adenine deaminase	EC:3.5.4.2	57357	94093	942.7	1690.9
1440	adk	adenylate kinase	EC:2.7.4.3	66570	71400	2995.0	3512.2
14520	pnp	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	EC:2.7.7.8	104895	69737	1450.5	1054.4
3570	arcC	carbamate kinase	EC:2.7.2.2	3769	3172	118.3	108.9

Pyrimidine metabolism

15630	pyrB	aspartate carbamoyltransferase	EC:2.1.3.2	143267	81715	4482.9	2795.7
15620	pyrC	dihydroorotase	EC:3.5.2.3	170178	90221	3872.7	2244.9
15600	pyrD	dihydroorotate dehydrogenase catalytic subunit	EC:1.3.1.14	107716	56295	3447.9	1970.2
15610	pyrK	dihydroorotate dehydrogenase electron transfer subunit		114035	54769	4348.8	2283.7
15580	pyrE	orotate phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.10	57617	36037	2717.4	1858.3
15590	pyrF	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	EC:4.1.1.23	70591	41089	2932.6	1866.4
12290	cmk	cytidylate kinase	EC:2.7.4.14	7533	9161	324.0	430.8
14690	pyrH	uridylate kinase	EC:2.7.4.22	55859	41833	2262.8	1852.9
14520	pnp	polynucleotide nucleotidyltransferase	EC:2.7.7.8	104895	69737	1450.5	1054.4
20670	pyrG	CTP synthase	EC:6.3.4.2	88737	75920	1625.4	1520.4
1500	rpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	EC:2.7.7.6	68257	88002	2115.5	2982.1
1150	rpoB	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	EC:2.7.7.6	163078	126583	1351.5	1147.0
1160	rpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	EC:2.7.7.6	151814	140721	1225.9	1242.4
20680	rpoE	DNA-directed RNA polymerase subunit delta		20907	22550	1091.5	1287.2
15490	rpoZ	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	EC:2.7.7.6	5691	6512	782.5	979.0
9390	polA	DNA polymerase I	EC:2.7.7.7	23947	23788	265.4	288.2
9260	dnaE	DNA polymerase III subunit alpha	EC:2.7.7.7	14633	13059	129.5	126.4
14630	polC	DNA polymerase III PolC-type	EC:2.7.7.7	50817	41364	347.2	309.0
20	dnaN	DNA polymerase III subunit beta	EC:2.7.7.7	18769	37636	480.9	1054.4
190	dnaX	DNA polymerase III subunit tau	EC:2.7.7.7	16929	17658	292.5	333.6
10910	holA	DNA polymerase III subunit delta	EC:2.7.7.7	2895	3492	82.9	109.3
330	holB	DNA polymerase III subunit delta'	EC:2.7.7.7	8097	9619	240.3	312.1
20500	upp	uracil phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.9	169498	102647	7879.8	5217.6
15650	pyrR	pyrimidine operon regulatory protein/uracil phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.9	36051	64071	1902.5	3696.8
2560	pdp	pyrimidine nucleoside phosphorylase	EC:2.4.2.2	5120	5138	115.2	126.4
6900	trxB	thioredoxin reductase	EC:1.8.1.9	17339	18967	534.0	638.7
23180	nrdD	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	EC:1.17.4.2	24498	8086	329.4	118.9
13080	nrdE	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alpha	EC:1.17.4.1	37613	110370	501.6	1609.5
13090	nrdF	ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta	EC:1.17.4.1	20943	64288	608.5	2042.4
9550	dut	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	EC:3.6.1.23	3275	3757	214.6	269.2
12820	thyA	thymidylate synthase	EC:2.1.1.45	9887	16638	301.6	555.0
2590	cdd	cytidine deaminase	EC:3.5.4.5	2214	2896	153.3	219.2
2580	punA	purine nucleoside phosphorylase	EC:2.4.2.1	4914	6365	176.4	249.8

8500	deoD	purine nucleoside phosphorylase	EC:2.4.2.1	9098	10321	370.1	459.0
10890	comEB	competence protein ComEB	EC:3.5.4.12	1222	1853	78.5	130.1
20600	tdk	thymidine kinase	EC:2.7.1.21	863	1457	42.3	78.2
300	tmk	thymidylate kinase	EC:2.7.4.9	5323	5097	247.5	259.1

Alanine, aspartate and glutamate metabolism

12650	AXY_12650	aspartate aminotransferase K00812 aspartate aminotransferase	EC:2.6.1.1	24638	24277		
		asparagine synthetase K01953 asparagine synthase					
8560	AXY_08560	(glutamine-hydrolysing)	EC:6.3.5.4	1787	1751		
22050	ald	alanine dehydrogenase	EC:1.4.1.1	31171	38177	820.3	1098.4
23840	purA	adenylosuccinate synthetase	EC:6.3.4.4	21107	155122	478.1	3841.8
4280	purB	adenylosuccinate lyase	EC:4.3.2.2	45117	185283	1019.6	4578.2
15630	pyrB	aspartate carbamoyltransferase	EC:2.1.3.2	143267	81715	4482.9	2795.7
4420	AXY_04420	glutamine synthetaseK01915 glutamine synthetase	EC:6.3.1.2	2690	1274		
4410	glmS	glucosamine-6-phosphate synthase	EC:2.6.1.16	2020	1436	32.3	25.1
4330	purF	amidophosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.14	21046	111201	433.5	2504.2

Glycine, serine and threonine metabolism

11850	AXY_11850	aspartokinase K00928 aspartate kinase	EC:2.7.2.4	37838	37994	819.1	899.2
14460	dapG	aspartokinase	EC:2.7.2.4	61652	55474	1486.2	1462.1
14470	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.11	57887	53830	1624.0	1651.1
8400	hom	homoserine dehydrogenase	EC:1.1.1.3	23004	29549	521.1	731.8
8420	thrB	homoserine kinase	EC:2.7.1.39	17940	15158	595.7	550.3
8410	thrC	threonine synthase	EC:4.2.3.1	25775	28076	710.8	846.6
20510	glyA	serine hydroxymethyltransferase	EC:2.1.2.1	116962	143947	2771.5	3729.5
21790	serC	phosphoserine aminotransferase	EC:2.6.1.52	31872	43204	864.3	1281.0
23920	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	EC:1.1.1.95	42689	51864	787.8	1046.5
		phosphoglycerate mutase family protein K01834					
12910	AXY_12910	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	14755	12867	787.2	750.5
		phosphoglycerate mutase family protein K01834					
23010	AXY_23010	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.11	9601	9508	490.7	531.4
18350	gpmI	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	EC:5.4.2.12	93751	126886	1787.6	2645.4
5190	AXY_05190	oxidoreductase K00018 glycerate dehydrogenase	EC:1.1.1.29	6727	9104	205.2	303.7
16170	pdhD	pyruvate dehydrogenase complex E3 component	EC:1.8.1.4	26319	123297	547.9	2806.2
11860	bkdD	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E3 subunit	EC:1.8.1.4	62358	35486	1279.0	795.8
13340	ilvA	threonine dehydratase	EC:4.3.1.19	26218	28574	609.4	726.2
21060	trpA	tryptophan synthase subunit alpha	EC:4.2.1.20	736	1130	27.4	46.0

21070	trpB	tryptophan synthase subunit beta	EC:4.2.1.20	1249	1646	30.3	43.6
Cystein and methionine metabolism							
1010	cysE	serine acetyltransferase	EC:2.3.1.30	3745	3644	166.9	177.6
860	cysK	cysteine synthase	EC:2.5.1.47	209983	115305	6655.9	3996.1
8520	patB	cystathionine beta-lyase	EC:4.4.1.8	24563	21153	614.9	579.0
8310	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate/homocysteine S-methyltransferase	EC:2.1.1.14	2452	6209	31.5	87.3
8620	metK	S-adenosylmethionine synthase	EC:2.5.1.6	11110	15757	271.2	420.5
10770	mtmN	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	EC:3.2.2.9	14524	7967	616.5	369.7
18850	AXY_18850	hypothetical protein K00558 DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	EC:2.1.1.37	164	261	10.3	18.0
14060	AXY_14060	modification methylase K00558 DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	EC:2.1.1.37	10287	17408	240.8	445.6
18620	luxS	S-ribosylhomocysteine lyase	EC:4.4.1.21	5794	5079	364.9	349.8
11850	AXY_11850	aspartokinase K00928 aspartate kinase	EC:2.7.2.4	37838	37994	819.1	899.2
14460	dapG	aspartokinase	EC:2.7.2.4	61652	55474	1486.2	1462.1
14470	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.11	57887	53830	1624.0	1651.1
8400	hom	homoserine dehydrogenase	EC:1.1.1.3	23004	29549	521.1	731.8
16750	metA	homoserine O-succinyltransferase	EC:2.3.1.46	6376	12301	206.1	434.8
		cystathionine gamma-synthase/O-acetylhomoserine (thiol)-lyase K01739					
19840	AXY_19840	cystathionine gamma-synthase	EC:2.5.1.48	1466	2356	39.1	68.7
20900	metY	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	EC:2.5.1.49	19062	32211	332.3	614.0
12650	AXY_12650	aspartate aminotransferase K00812 aspartate aminotransferase	EC:2.6.1.1	24638	24277	608.9	656.1
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis							
13340	ilvA	threonine dehydratase	EC:4.3.1.19	26218	28574	609.4	726.2
16500	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	EC:4.2.1.35 4.2.1.33	47064	63386	979.7	1442.7
16510	leuD	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	EC:4.2.1.35 4.2.1.33	20821	26195	1031.8	1419.4
16490	leuB	3-isopropylmalate dehydrogenase	EC:1.1.1.85	21459	32628	581.9	967.4
16450	ilvB	acetolactate synthase large subunit	EC:2.2.1.6	43158	71093	732.8	1319.8
16460	ilvN	acetolactate synthase small subunit	EC:2.2.1.6	15043	21099	839.2	1287.0
16470	ilvC	ketol-acid reductoisomerase	EC:1.1.1.86	46394	66448	1312.8	2055.9
17500	AXY_17500	dihydroxy-acid dehydratase	EC:4.2.1.9	16481	13098		
23140	AXY_23140	dihydroxy-acid dehydratase	EC:4.2.1.9	21205	23789		
13380	ilvE	branched-chain amino acid aminotransferase	EC:2.6.1.42	28023	33367	762.1	992.1
16480	leuA	2-isopropylmalate synthase	EC:2.3.3.13	45465	57808	872.0	1212.3
Lysine biosynthesis							
8400	hom	homoserine dehydrogenase	EC:1.1.1.3	23004	29549	521.1	731.8
11850	AXY_11850	aspartokinase K00928 aspartate kinase	EC:2.7.2.4	37838	37994	819.1	899.2

14460	dapG	aspartokinase	EC:2.7.2.4	61652	55474	1486.2	1462.1
14470	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.11	57887	53830	1624.0	1651.1
14450	dapA	dihydrodipicolinate synthase	EC:4.3.3.7	56083	44005	1881.5	1614.2
12560	dapB	dihydrodipicolinate reductase	EC:1.17.1.8	10660	9717	388.3	387.0
12070	lysA	diaminopimelate decarboxylase	EC:4.1.1.20	4155	11254	93.7	277.4
6490	ddh	meso-diaminopimelate D-dehydrogenase	EC:1.4.1.16	24972	26772	741.0	868.6
		UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate-2,6-diaminopimelate					
15910	murE	ligase	EC:6.3.2.13	6941	10294	137.7	223.3
15900	murF	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase	EC:6.3.2.10	8859	10598	192.2	251.4
Arginine and proline metabolism							
2850	aldH	aldehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.3	1253	1140	27.0	26.9
19810	AXY_19810	amidase K01426 amidase	EC:3.5.1.4	19730	13004	388.3	279.9
16630	proC	pyrroline-5-carboxylate reductase	EC:1.5.1.2	2753	4356	99.2	171.6
13370	proB	glutamate 5-kinase	EC:2.7.2.11	2139	3082	55.8	88.0
13360	proA	gamma-glutamyl phosphate reductase	EC:1.2.1.41	5843	7496	137.1	192.3
12650	AXY_12650	aspartate aminotransferase K00812 aspartate aminotransferase 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase/2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate	EC:2.6.1.1	24638	24277	608.9	656.1
2750	kdgA	aldolase	EC:4.1.3.16 4.1.2.14	489	1340	22.5	67.5
3140	argF	ornithine carbamoyltransferase	EC:2.1.3.3	831	282	25.8	9.6
4420	AXY_04420	glutamine synthetase K01915 glutamine synthetase	EC:6.3.1.2	2690	1274	41.5	21.5
3570	arcC	carbamate kinase	EC:2.7.2.2	3769	3172	118.3	108.9
21600	argJ	glutamate N-acetyltransferase/amino-acid N-acetyltransferase	EC:2.3.1.1 2.3.1.35	736	466	17.5	12.1
21590	argB	acetylglutamate kinase	EC:2.7.2.8	574	406	21.3	16.5
21610	argC	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	EC:1.2.1.38	424	272	12.0	8.4
21580	argD	acetylornithine aminotransferase	EC:2.6.1.11	946	748	23.6	20.4
Histidine metabolism							
13460	hisG	ATP phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.17	4353	1306	206.3	67.7
13470	hisZ	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit		6611	2069	174.9	59.9
		phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP					
13410	hisIE	pyrophosphohydrolase	EC:3.5.4.19 3.6.1.31	2773	1059	124.2	51.9
		1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]					
13430	hisA	imidazole-4-carboxamide isomerase	EC:5.3.1.16	2984	1374	122.4	61.6
13420	hisF	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	EC:4.1.3.-	1602	774	61.3	32.4
13440	hisB	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	EC:4.2.1.19	2802	1149	138.9	62.3

12460	hisC	histidinol-phosphate aminotransferase	EC:2.6.1.9	40545	35389	1078.6	1029.3
3750	AXY_03750	histidinol-phosphatase K04486 histidinol-phosphatase (PHP family)	EC:3.1.3.15	2078	2006	75.4	79.6
13480	hisI	histidinol-phosphatase	EC:3.1.3.15	2453	2450	89.0	97.2
13450	hisD	histidinol dehydrogenase	EC:1.1.1.23	9509	3898	216.4	97.0
2850	aldH	aldehyde dehydrogenase	EC:1.2.1.3	1253	1140	27.0	26.9

Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis

9030	aroA	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	EC:5.4.99.5 2.5.1.54	53042	91122	1458.7	2739.9
12440	aroB	3-dehydroquinate synthase	EC:4.2.3.4	36860	29842	999.6	884.8
21120	AXY_21120	hypothetical protein K11646 3-dehydroquinate synthase II	EC:1.4.1.24	2154	2010	114.9	117.2
18170	aroD	3-dehydroquinate dehydratase	EC:4.2.1.10	10269	11640		
10820	aroD	shikimate dehydrogenase	EC:1.1.1.25	2076	5776		
11520	aroK	shikimate kinase	EC:2.7.1.71	1403	901	83.0	58.3
12480	aroE	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	EC:2.5.1.19	46503	41242	1053.4	1021.4
12430	aroF	chorismate synthase	EC:4.2.3.5	50133	40747	1258.2	1118.1
21110	trpE	anthranilate synthase component I	EC:4.1.3.27	986	1210	20.9	28.0
21100	trpD	anthranilate phosphoribosyltransferase	EC:2.4.2.18	705	683	20.5	21.8
21080	trpF	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	EC:5.3.1.24	319	474	15.4	25.0
21090	trpC	indole-3-glycerol phosphate synthase	EC:4.1.1.48	527	800	20.1	33.4
21060	trpA	tryptophan synthase subunit alpha	EC:4.2.1.20	736	1130	27.4	46.0
21070	trpB	tryptophan synthase subunit beta	EC:4.2.1.20	1249	1646	30.3	43.6
12450	aroH	chorismate mutase	EC:5.4.99.5	9837	9183	780.8	796.9
10280	pheB	ACT domain-containing protein PheB	EC:5.4.99.5	3304	3532	215.0	251.3
12470	tyrA	prephenate dehydrogenase	EC:1.3.1.12	35354	30985	940.5	901.2
10290	pheA	prephenate dehydratase	EC:4.2.1.51	6299	6574	214.3	244.5
12650	AXY_12650	aspartate aminotransferase K00812 aspartate aminotransferase	EC:2.6.1.1	24638	24277	608.9	656.1
12460	hisC	histidinol-phosphate aminotransferase	EC:2.6.1.9	40545	35389	1078.6	1029.3

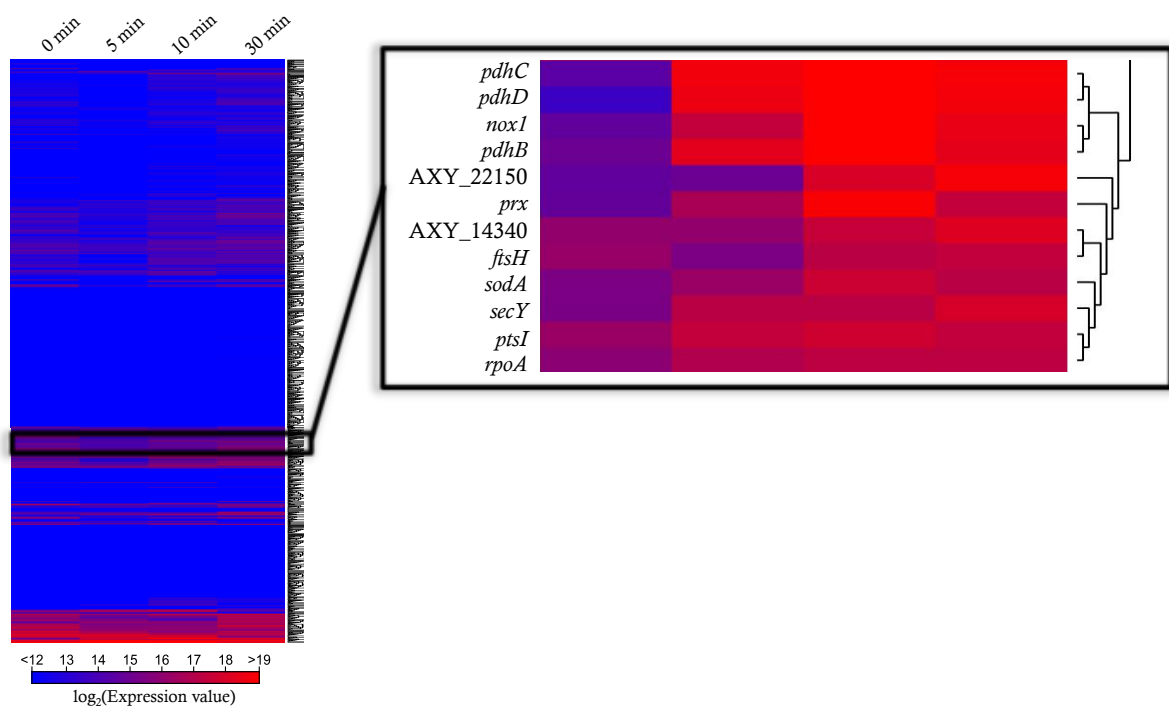


Figure 1-2-5. Whole genes heat map and cluster map based on whole transcriptional expression analysis by RNA-seq.

小括

本章では、ゲノム解析、RNA-seq 解析を用いて *A. xylanus* 糖代謝、核酸代謝、脂肪酸代謝、アミノ酸代謝経路を転写レベルでの存在を明らかにした。呼吸鎖の無い *A. xylanus* はエネルギー生産を解糖系、ピルビン酸代謝に依存しているため、本代謝経路は RNA-seq 解析に加え、ノーザン解析で確認した。これらの結果はこれまでに生化学的な実験により推定していた代謝経路を支持する結果と言える。

これまでの研究より *A. xylanus* の好気代謝は、Nox-Prx system, PDH complex, SOD が重要であることを推定している。この中で酸素代謝へ関与するのは Nox-Prx と SOD である。ゲノム解析により、Nox-Prx と SOD 以外で酸素代謝への関与報告のある遺伝子として、*dps*, *fer*, *fdxA*, *nox2*, *trxA*, *trxB*, *yumC* の存在が見いだされた。中でも *fer*, *fdxA*, *trxA*, *trxB*, *yumC* の酸素による転写誘導が観察されたことから、これら遺伝子の酸素代謝経への関与が推察される。これらの酵素遺伝子以外での酸素代謝に関与する酵素遺伝子の探索の為に、嫌気培養途中に酸素添加し、0, 5, 10, 30 min で集菌した菌体から mRNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した。得られたデータを基に、全遺伝子のクラスター解析を試みたところ、*nox1*, *prx*, *pdhBCD*, *sodA* は近接するクラスターに分類された。本クラスターは好気代謝に関与することが示唆される。本クラスター内には AXY_22150, 14340, *ftsH*, *secY*, *ptsI*, *rpoA* が分類された。これらタンパク遺伝子の機能を Table 1-2-6 に示す。

Table 1-2-6. *nox1*, *prx*, *pdhBCD*, *sodA* を含む近接クラスター内に分類された遺伝子。

Gene ID	Gene name	Product	Reference
AXY_22150	—	ribonucleotide reductase	[10, 11]
AXY_14340	—	hypothetical protein	
AXY_00820	<i>ftsH</i>	ATP-dependent protease FtsH	[12]
AXY_01430	<i>secY</i>	preprotein translocase SecY subunit	[13]
AXY_18290	<i>ptsI</i>	phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	[14, 15]
AXY_01500	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	

nox1, *prx*, *pdhBCD*, *sodA* と同クラスターに分類されたことから、好気代謝への関与が示唆されるが、これら遺伝子の酸素代謝への関与報告は他菌種に於いても無い。これら遺伝子がどのように好気代謝へ関与するかは興味を持たれるが、更なる解析が必要である。現在の考察としては、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析により、*A. xylanus* の酸素代謝へ関与し得る酵素遺伝子の特定には至らなかったとしている。そこで第二章では生化学的な酸素代謝活性の観点から、*A.*

xylanus の酸素代謝酵素に着目した解析を試みた。

第二章 菌体内遊離フラビンの定量分析

序論

RNA-seq を用いた解析の結果、*Amphibacillus xylanus* の酸素代謝酵素としてこれまでに見いだした Nox-Prx 系, SOD 以外に、酸素代謝への関与報告のある酵素代謝遺伝子を特定することはできなかった。そこで本章では Nox の酸素への親和性がタンパク質非結合型フラビン (遊離フラビン) 存在下で上昇することに着目した。

一般に生体内におけるフラビン (FAD, FMN, Riboflavin) はタンパク質と結合した形で存在しているとされ、タンパク質非結合型フラビン (遊離フラビン) の生理的な意義、生体細胞内での存在は不明であった。しかし、近年研究において、遊離フラビンが関与する反応系が報告されつつある[16-20]。*A. xylanus* において主要な酸素代謝酵素であると推定される Nox は、酸素に対する k_m 値が 1.7 mM 程度である。これは一般的な好気性菌の主要な酸代謝複合体である呼吸鎖の酸素への k_m 値が $1 \mu M$ 以下であることと比べると 1,000 倍以上高い。過去の研究に於いて Nox の酸素代謝活性はフラビン (FAD) を添加することで著しく上昇すること[21]と細胞内に遊離フラビンが存在することを見いだしており[22]、本菌の酸素代謝への遊離フラビンの関与が示唆された。そこで本章ではまず、*A. xylanus* の酸素吸収活性を定量的な評価と、細胞内遊離フラビンの定量分析を試みた。

第一節 菌体の酸素吸収量の比較

これまでに、*A. xylanus* の酸素吸収力の定量的な測定は行われていないため、本節では、定量的な酸素吸収活性の測定を試み、同測定方法で呼吸鎖を有する好気性菌である大腸菌と、呼吸鎖を持たない通性嫌気性菌である乳酸菌との酸素吸収活性の比較を試みた。

第一項 培養、湿菌体、乾燥菌体の作製

1. 培地の調製

1-1. GY 培地の調製

第一章 第二節 第一項に準じて GY 培地を調製する。

2-1. LB 培地の調製

Table 2-1-1 に準じて試薬を調製し、121 °C 20 min オートクレーブす

る。

Table 2-1-1. Compositions of LB medium.

Reagent	Percentage (%)	g / l
Bacto trypton (DIFICO)	1.00	10
Yeast Extract (DEFICO)	0.50	5
NaCl	0.50	5

3-1. GYP 培地の調製

以下の試薬を調製する。

【 Salt solution 】

FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.0 %
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.2 %
NaCl	0.2 %

【 Tween 80 solution】

Tween80	5.0 %
---------	-------

調整した試薬を用いて Table 2-1-2 に準じて試薬を調整し。121℃
20 min オートクレーブする。

Table 2-1-2. Compositions of GYP medium.

Reagent	Percentage (%)	g / ℓ
Glucose	1.00	10
Yeast Extract (DIFICO)	1.00	10
Polypepton	0.50	5
Beef Extract	0.20	2
Tween 80 solution	1.0 (ml)	10
Solt solution	0.5 (ml)	5
Sodium acetate•3H ₂ O	0.20	2

2. 培養、集菌

1-2. *A. xylanus* の培養

胞子状態で低温保存してある *A. xylanus* を 10 ml の嫌気 GY 培地 (Table 1-4.) に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ, シリコ栓 (前培養)、1 ℓ / 5 ℓ 三角フラスコ, 棉栓 (本培養) とスケールアップし培養を行った。1 ℓ 培養では好気条件 (150 rpm) で培養し、植菌は前培養培地に対して 1 / 100 量を、本培養培地に対しては 1 / 10 で行った。生育曲線を Figure 2-1-1 に示す。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で全量を 8,000 rpm 3 min RT (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後、pH 9.7 50 mM CO₃ buffer (50mM Na₂CO₃ と 50 mM NaHCO₃ を混合し pH を調整する) にて 1 回菌体をウォッシュした。

2-2. *Escherichia coli* JM 109 (*E. coli*) の培養

-80 °C にてグリセロールストックしてある *E. coli* を 1 白金ドリル LB 培地に植菌し、37 °C で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ, シリコ栓 (前培養)、1 ℓ / 5 ℓ 三角フラスコ, 棉栓 (本培養) とスケールアップし培養を行った。1 ℓ 培養では好気条件 (150 rpm) で培養し、植菌は前培養培地に対して 1 / 100 量を、本培養培地に対しては 1 / 10 で行った。生育曲線を Figure 2-1-1 に示す。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で全量を 8,000 rpm 3 min RT (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後 pH 7.0 50 mM Na-pi buffer で 1 回菌体をウォッシュした。

3-2. *Lactobacillus plantarum* WCSF1 (*L. plan.*) の培養

スタブにて保存してある *L. plan.* を 3 白金耳 GYP 培地に植菌し、37 °C で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ、シリコ栓（前培養）、1 l / 5 l 三角フラスコ、棉栓（本培養）とスケールアップし培養を行った。1 l 培養では好気条件（150 rpm）で培養し、植菌は前培養培地に対して 1 / 100 量を、本培養培地に対しては 1 / 10 で行った。生育曲線を Figure 2-1-1 に示す。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で全量を 8,000 rpm 3 min RT（BECKMAN AvantiTM HP-25 Roter ID JA10.5）で素早く集菌した。集菌後 pH 7.0 50 mM Na-pi buffer で 1 回菌体をウォッシュした。

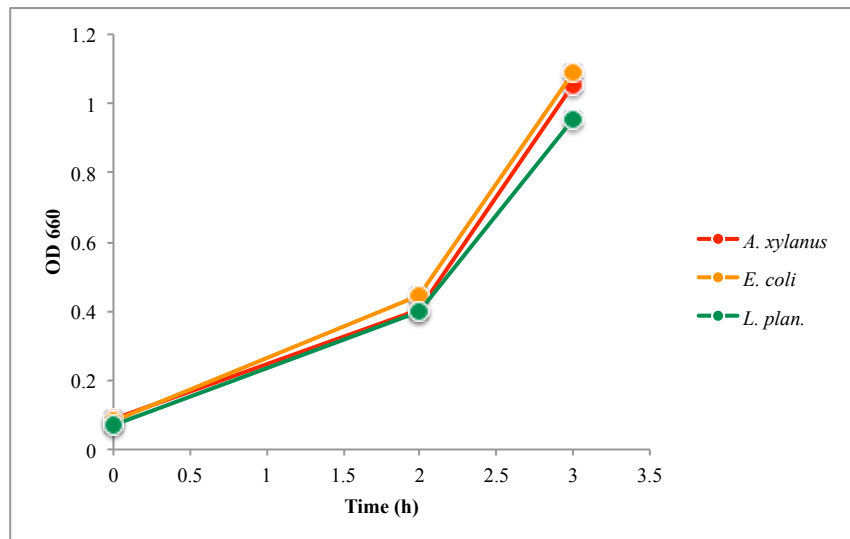


Figure 2-1-1. Growth curve of *Amphibacillus xylanus*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* cultured under aerobic conditions.

3. 湿菌体作製

集菌した菌体を各 buffer に溶かし、適量遠心管（JLA 25.5 用）に分注する。20,000 rpm 20 min 4℃（Beckman Avanti™ HP-25 Roter ID JLA 25.5）での遠心、脱水、重量測定、質量プロットを繰り返し、減少量が一定になるまで行う。重量減少が一定となった時点で直近の 3 点の近似線を引き、プロットグラフの y 軸との交点を湿菌体重量とした。

4. 乾燥菌体の作製

作製した湿菌体を乾熱機（Drying Oven DS600 YAMATO 社）により 105℃で乾燥させた（オーバーナイト時は 80℃に設定する）。乾燥、3～5 時間毎質量測定を繰り返し、直前の測定値との重量差が±0.0005 g 以下になるまで繰り返し、最終重量を乾燥菌体重量とした。

第二項 酸素吸収量の測定

1. 菌体の調整

集菌した菌体を本培養培地の 1 / 50 量の各 buffer で懸濁した。常温保存し、素早く酸素吸収能を測定した。

2. 菌体酸素吸収活性の測定

溶存酸素の検出には YSI MODEL 5300 Biological oxygen monitor（YSI 社）、レコーダーは Unicorder U-228（PANTONS 社）を用いた。ウォッシュに用いた培地に終濃度 1 %（g/l）となるように glucose（wako 一級）を溶解する。glucose 溶解 buffer を測定温度で空気を 15 min バブリングし、解放条件で 15 min 静置する。バブリング、静置後の buffer を測定セルに注入し、溶存酸素値の安定化を待つ。安定を確認後注入 buffer 量に対して 1 / 50 量のサンプルを注入し、酸素吸収活性を測定した。測定値は 1 min あたりの酸素減少量を重量比より算出した菌量を基に、1 g の乾燥菌体重量あたりで算出した。

3. 結果・考察

呼吸を欠如した乳酸菌が低い酸素代謝活性を示すのに対して、*A. xyloxy* は呼吸鎖を有する大腸菌と同等な酸素吸収活性を有することが見いだされた（Figure 2-1-2）。これにより、呼吸鎖に匹敵する酸素代謝系の存在が推察される。しかし、過去の研究により同定された酸素代謝酵素

(酸素還元酵素)は Nox のみである。そこで遊離フラビンが関与した酸素代謝系の存在を考察した。

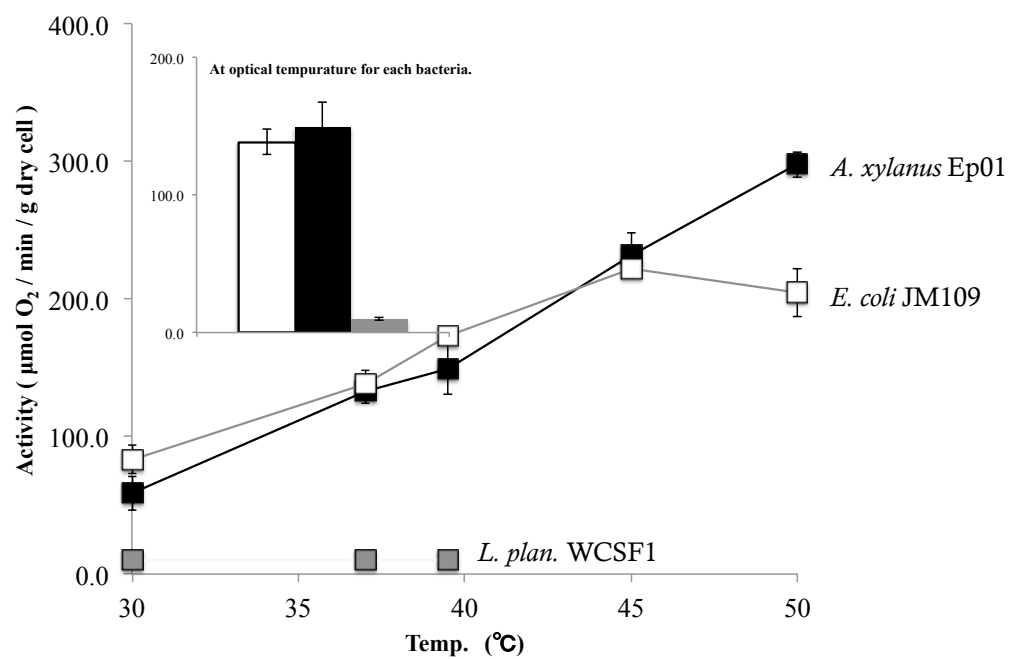


Figure 2-1-2. Oxygen absorption by *Amphibacillus xylanus*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum*.

第二節 細胞破碎法の検討

過去に行われた細胞内遊離フラビンの定量分析手法は超音波破碎法とゲル濾過による遊離フラビンの分離を行っている。しかし、この調製法では下記にする2点において、定量性が不確かであった。まず、細胞破碎法の検討が行われておらず、細胞破碎に伴うタンパク質結合性フラビンの、細胞破碎に伴う脱離が検討されていない。また、細胞破碎液中からの遊離フラビンの分離にゲル濾過法を用いているのだが、本調製法は遊離フラビンの検出には適しているものの、操作が煩雑であることに加え、ゲル濾過へのフラビン吸着を計算により補填している点で定量性が不十分である。そこで、本章では生体内における遊離フラビン含量の定量分析法の改良を試みた。

第一項 培養、集菌

1. GY 培地の作製

第一章 第二節 第一項に準じて GY 培地を調製する。

2. *A. xylanus* の培養

孢子状態で低温保存してある *A. xylanus* を 10 ml の嫌気 GY 培地 (Table 1-4.) に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ, シリコ栓 (前培養)、1 l / 5 l 三角フラスコ, 棉栓 (本培養) とスケールアップし培養を行った。1 l 培養では好気条件 (150 rpm) で培養し、植菌は前培養培地に対して 1 / 100 量を、本培養培地に対しては 1 / 10 で行った。生育曲線を Figure 2-1-1 に示す。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で全量を 8,000 rpm 3 min 4 °C (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて 3 回菌体をウォッシュした。ウォッシュ後菌体量を測定し、菌体量に対して 2 倍量の Na-pi buffer で懸濁した。懸濁後菌体を 1.5 ml エッペンに分注し、15,000 rpm 2 min 4 °C (TOMMY MX-305) で集菌し、菌体量を測定した。

第二項 破碎効率の検討

1. 菌体破碎

1-1. French Press による破碎

保存菌体を融解し、菌量に対して4倍量のpH 7.0 50 mM Na-pi bufferで懸濁する。French Press 30,000 psi (AMICON 社) を用いて130 psi (kg/cm³) 条件で破碎した。1回のセル通過毎に冷却し、できる限り低温を保ちながら行った。破碎セル通過毎にサンプリングした。破碎液を15,000 rpm 5 min 4 °Cで遠心し無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を更に100,000 rpm 2 h 4 °C (Beckman Optima MAX-XP) で遠心し、可溶性画分を得た。本実験は3回繰り返し実験した。

2-1. Sonication による破碎

保存菌体を融解し、菌量に対して4倍量のpH 7.0 50 mM Na-pi bufferで懸濁する。Sonication (BRONSON 社) を用いてPuls 0.1 duty 50 % 4 °Cで破碎した。破碎時間経過毎 (2.5, 5, 10, 20 min) にサンプリングした。破碎液を15,000 rpm 5 min 4 °Cで遠心し無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を更に100,000 rpm 2 h 4 °C (Beckman Optima MAX-XP) で遠心し、可溶性画分を得た。本実験は3回繰り返し実験した。

3-1. Maltibeads shocker による破碎

保存菌体を凍結状態でMaltibeads shocker 用破碎チューブへ移し、ジルコニアコーンを同封する。凍結アダプターに設置し、液体窒素で十分に冷却してから3,000 rpm で破碎した。80, 160, 240, 320 sec 破碎し、破碎後に菌体量の4倍量のpH 7.0 50 mM bufferで懸濁した。破碎液を15,000 rpm 5 min 4 °Cで遠心し無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を更に100,000 rpm 2 h 4 °C (Beckman Optima MAX-XP) で遠心し、可溶性画分を得た。本実験は3回繰り返し実験した。

2. NADH oxidase 活性測定

上述の3種類の破碎法 (French Press, Sonication, Maltibeads shocker) から調製した無細胞抽出液と分光計 (HITACHI U-3310)、アプリケーション (UV solution ver. 2.1) を用いて測定した。NADHは終濃度で100 μMとなるように調製した。活性値は1 ml の無細胞抽出液あたりの1 min 間の酸素の減少量で算出した。活性値は3回の測定の平均として算出した。

3. Protein assay

ACE (SIGMA 社) とプロテインアッセイ (BIO-RAD) を用いて無細胞抽出液中のタンパク質含量を測定した。手法の詳細はBIO-RAD ウェブサ

イト (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>) を参照する。タンパク量は3回の測定の平均値として算出した。

4. フラビン含量分析

1-4. サンプルの調製

上述の3種類の破碎法(French Press, Sonication, Maltibeads shocker)から調製した無細胞抽出液を総フラビン画分とした。また、各可溶性画分を NANOSEP 30 kDa cut off membrane filter, NANOSEP 3 kDa cut off membrane filter (日本 PALL 社) を順に通過させ、可溶性画分中のタンパク質をすべて除去した画分を遊離フラビン画分とした。なお、遊離フラビン画分を SDSPAGE (銀染色), protein assay 法にて測定したが、タンパク質は検出できなかった (Data not shown)。

2-4. フラビン含量の測定

上述の方法で調製した総フラビン、遊離フラビンサンプルを、ホットメタノール処理によるフラビン抽出、HPLC を用いた測定により、フラビン含量を測定した。手法の詳細は[23]を参照。フラビン含量は3回の測定の平均値として算出した。

5. 顕微鏡観察

上述の3種類の破碎法 (French Press, Sonication, Maltibeads shocker) から調製した破碎液を顕微鏡で観察した。

6. 結果

NADH oxidase 活性測定、protein assay、フラビン分析の結果を Figure 2-2-1 に示す。Maltibeads shocker 法では破碎時間に応じて遊離フラビン含量が増加し、320 秒後には総フラビン含量の 80%にまで増加した(Data not shown)。これは破碎法の性質上、タンパク質からのフラビンの解離が原因であると推察される。

Sonication 法では 10 min 以降、French Press 法では 2 pass 以上でタンパク質含量、酵素活性、総 FAD 含量、遊離 FAD 含量がほぼ一定になっていることから、この条件下でおよそすべての細胞が破碎されていると推定される。顕微鏡観察でもこれは支持される(Data not shown)。主要な遊離フラビンは FAD で、遊離 FAD 含量は破碎時間に関係なく総 FAD 含量

の約 20～30%程度であった。これにより破碎によるタンパク質結合 FAD の解離が起きていないものと考えられる。一方で、NADH oxidase 活性値は Sonication 法よりも French Press 法の方が高く検出された。これは French Press 法よりも Sonication 法の方がタンパク質の変性を起こしやすい為ではないかと考察し、タンパク質変性が少ない French Press 法にて、3 pass の破碎が遊離フラビン定量に最も適していると判断した。

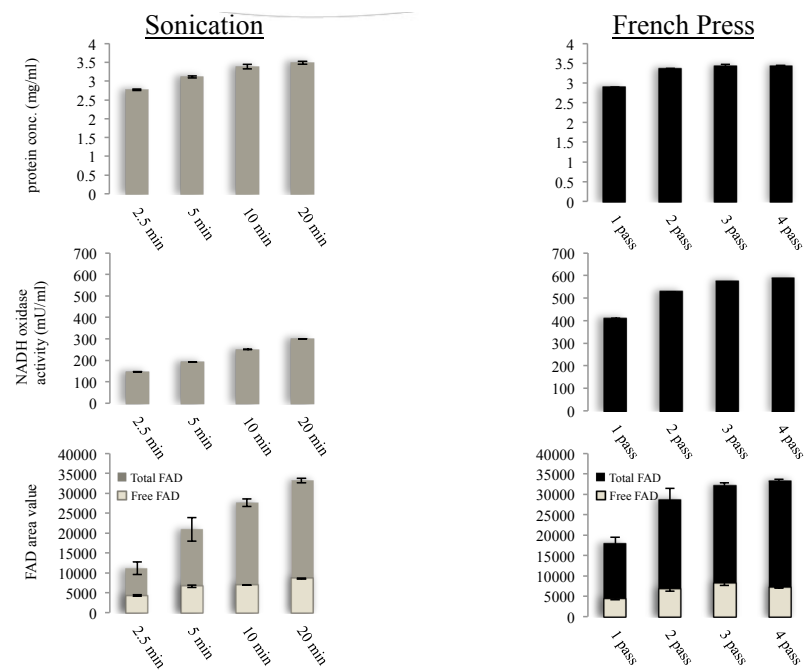


Figure 2-2-1. 破碎効率の比較検討

第三節 菌体内フラビンの定量分析

第一項 培養、集菌、湿菌体、乾燥菌体の作製

1. GY 培地の調製

第一章 第二節 第一項を参照する。

2. 培養、集菌、

1-2. O₂ 0 % 培養

孢子状態で低温保存してある *A. xyloxydans* を 10 ml の嫌気 GY 培地に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 120 ml バイアル (前培養)、3 l / 10 l ジャーファメンター (本培養) とスケールアップし培養を行った。3 l 培養には嫌気条件 (N₂ 吹き込み) で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 10 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で培養液全量を採取し 8,000 rpm 5 min 4 °C (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて 3 回菌体をウォッシュした。3 l 培養時の詳細な条件は Table 2-3-1 に示す。生育曲線を Figure 2-3-1 に示す。

2-2. O₂ 10 % 培養

孢子状態で低温保存してある *A. xyloxydans* を 10 ml の嫌気 GY 培地に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ (前培養)、3 l / 10 l ジャーファメンター (本培養) とスケールアップし培養を行った。3 l 培養では 10 % O₂ 条件 (10 % O₂ 吹き込み) で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 10 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で培養液全量を採取し 8,000 rpm 5 min 4 °C (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて 3 回菌体をウォッシュした。ジャーファメンターを用いた 3 l 培養時の詳細な条件は Table 2-3-1 に示す。生育曲線を Figure 2-3-1 に示す。

3-2. O₂ 21 % 培養

孢子状態で低温保存してある *A. xyloxydans* を 10 ml の嫌気 GY 培地

に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ（前培養）、3 l / 10 l ジャーファメンター（本培養）とスケールアップし培養を行った。3 l 培養では好気条件(Air 吹き込み)で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 10 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で培養液全量を採取し 8,000 rpm 5 min 4 °C（BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5）で素早く集菌した。集菌後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて 3 回菌体をウォッシュした。ジャーファメンターを用いた 3 l 培養時の詳細な条件は Table 2-3-1 に示す。生育曲線を Figure 2-3-1 に示す。

4-2. O₂ 40 % 培養

孢子状態で低温保存してある *A. xyloxydans* を 10 ml の嫌気 GY 培地に 1 ml 植菌し 39.5 °C, 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 ml / 500 ml 三角フラスコ（前培養）、3 l / 10 l ジャーファメンター（本培養）とスケールアップし培養を行った。3 l 培養では 40 % O₂ 条件(40 % O₂ 吹き込み)で培養し、植菌はすべて培地に対して 1 / 10 量で行った。O.D.₆₆₀ ≒ 1.0 付近で培養液全量を採取し 8,000 rpm 5 min 4 °C（BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5）で素早く集菌した。集菌後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて 3 回菌体をウォッシュした。ジャーファメンターを用いた 3 l 培養時の詳細な条件は Table 2-3-1 に示す。生育曲線を Figure 2-3-1 に示す。

Table 2-3-1. Summary of culture condition for flavin analysis

	O ₂ conc. (%)			
	0	10	21	40
Instrument	Jarfermenter	Jarfermenter	Jarfermenter	Jarfermenter
Company	MARUBISHI	MARUBISHI	MARUBISHI	MARUBISHI
Type	MDL-1001S	MDL-1001S	MDL-1001S	MDL-1001S
Scale (L)	10	10	10	10
Medium volume (L)	3	3	3	3
Gass	N ₂ gass	N ₂ :90 %, O ₂ :10 % gass	air	N ₂ :60 %, O ₂ :40 % gass
Agit (rpm)	50	100	100	100
Airation (vvm)	0.5	0.5	0.5	0.5
Culture condition				

Temp.	39.5	39.5	39.5	39.5
pH	9.75	9.75	9.75	9.75

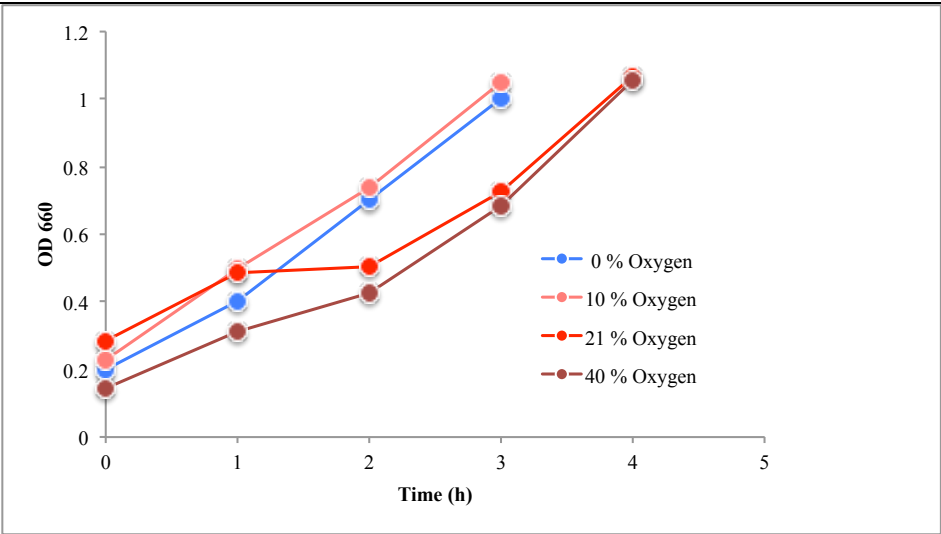


Figure 2-3-1 Growth curve of *Amphibacillus xylanus* cultured under 0, 10, 21, 40 % oxygen conditions.

3. 湿菌体の作製

手法は第二章 第一節 第一項 3 に準ずる。

4. 乾燥菌体の作製

手法は第二章 第一節 第一項 4 に準ずる。

第二項 菌体内フラビン含量定量分析

1. 菌体破碎

手法は第二章 第二節 第二項 1-1 に準ずる。

2. サンプルの調製

手法は第二章 第二節 第二項 4 に準ずる。

3. HPLC による分析

手法は第二章 第二節 第二項 4 に準ずる。

4. 結果

分析結果を Table 2-3-2 と Table 2-3-3 に示す。

Table 2-3-2. Flavins concentration (nmol/g dry cell) in *Amphibacillus xylanus* cultured under 0, 10, 21, 40 % oxygen conditions.

		O ₂ concentration			
		0%	10%	21%	40%
FAD	Total	70.6 (±10.9)	130.7 (±32.5)	186.9 (±55.3)	193.5 (±13.2)
	Free	16.7 (±3.4)	33.6 (±1.9)	31.4 (±1.2)	40.2 (±6.6)
FMN	Total	50.9 (±4.9)	94.1 (±26.5)	105.0 (±13.3)	110.6 (±12.1)
	Free	4.2 (±1.1)	11.4 (±4.2)	10.8 (±3.4)	9.0 (±3.6)
Riboflavin	Total	ND	9.2 (±2.5)	14.2 (±10.4)	8.4 (±1.8)
	Free	ND	ND	5.2 (±3.8)	5.2 (±0.0)

(nmol / g dry cell, ± : SD, n=3)

Table 2-3-3. Flavins concentration (nmol/g dry cell) in *Amphibacillus xylanus* cultured under 0, 10, 21, 40 % oxygen conditions.

		O ₂ concentration			
		0%	10%	21%	40%
FAD	Free	4.2 (±0.9)	8.4 (±0.5)	7.9 (±0.3)	10.1 (±1.7)
FMN	Free	1.1 (±0.3)	2.8 (±1.1)	2.7 (±0.9)	2.3 (±0.9)
Riboflavin	Free	ND	ND	1.3 (±0.9)	0.7 (±0.0)

(μM, ± : SD, n=3)

第四節 小括

本章では、細胞破碎法、遊離フラビンの調製法を検討し、生理的な細胞内遊離フラビン濃度の測定を行った。本解析の結果、生理的遊離フラビン濃度は 21 % 酸素存在下では約 FAD 8 μ M と算出された (Table 2-3-2, 3)。嫌気条件下と比較すると酸素存在下(酸素濃度 10, 21, 40%条件下)で約 2 倍に増加していることから、遊離フラビンの酸素代謝経の関与が示唆される。酸素濃度の変化 (10, 21, 40 %) による有意な増加は見られなかった。前任者らは遊離フラビン濃度を FAD 13 μ M[22]と報告しているが、操作の煩雑さと算出方法にゲル濾過カラムへのフラビン吸着分の計算による補填が含まれていることから、生理的遊離フラビン濃度は、今回の調整法を用いて測定された 8 μ Mの方が定量性があると考察した。

また、Nox の遊離フラビンによる活性化の実験[21]は、FAD 150 μ M 存在下で測定が行われている。今回の測定濃度は本実験の 1 / 15 倍である。そこで次章では、生理的な遊離フラビン濃度下での酸素代謝酵素の検討を試みた。

第三章 生理的遊離フラビン濃度条件下で酸素代謝活性を示す酵素の精製と機能解析

序論

前章において細胞内遊離フラビンの存在を確証し、細胞内生理的遊離フラビン濃度を FAD $8 \mu\text{M}$ と算出した。これまでに *A. xylanus* の酸素代謝酵素として同定された酵素は Nox のみである。Nox は遊離フラビン存在下で酸素への K_m 値が $1 \mu\text{M}$ 以下にまで減少するが、この酵素反応で用いられたフラビン濃度は FAD : $150 \mu\text{M}$ である。これは前章にて算出した生理的な遊離フラビン濃度と比較して、150 倍以上である。そこで本章では生理的な遊離フラビン存在下で酸素代謝する酵素の探索を試み、精製された酵素の機能解析を試みた。

第一節 好気条件下の生理的遊離フラビン濃度下で酸素代謝活性を示す酵素の探索

第一項 培養、集菌、菌体破碎

1. 培地の調製

第一章 第二節 第一項 1 に準じて GY 培地を作製した。

2. 培養

孢子状態で低温保存してある *A. xylanus* を 10 mL の嫌気 GY 培地に 1 mL 植菌し 39.5°C , 8 h 静置培養で菌を起こし、同培地を用いて 100 mL / 500 mL バッフル付き三角フラスコ（前培養）、 1.5 L / 5 L バッフル付き三角フラスコ（本培養）とスケールアップし培養を行った。本培養では好気条件（ 150 rpm ）で培養し、植菌はすべて培地に対して $1 / 100$ 量で行った。生育曲線を Figure 3-1-1 に示す。 $\text{O.D.}_{660} \approx 1.0$ 付近で全量を $8,000 \text{ rpm}$ 3 min RT（BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5）で素早く集菌した。集菌後、 $\text{pH } 7.0$ $50 \text{ mM Na-pi buffer}$ にて 3 回菌体を洗浄し、菌量を測定した。菌量に対して 2 倍量の同 buffer で懸濁し、 -80°C にて保存した。

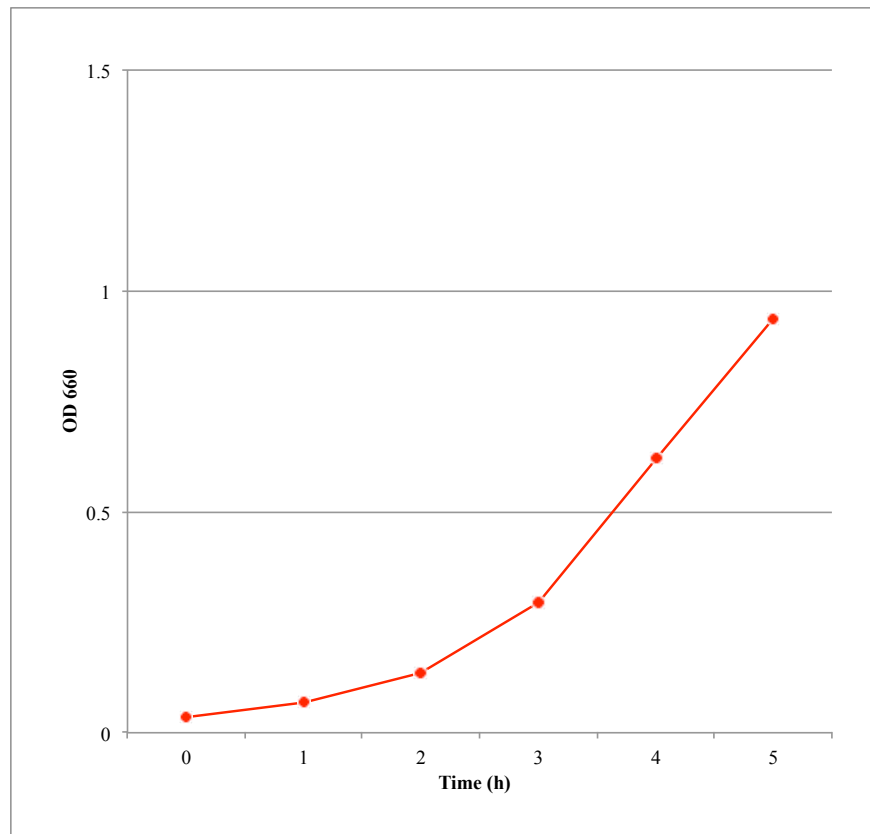


Figure 3-1-1. Growth curve of aerobic cultured *Amphibacillus xylnus*.

3. 菌体破碎

菌体を解凍し、完全に溶けきる前に倍量の buffer を加え懸濁する。菌体重量 $\times 1/1000$ 量 (60 g の菌体であれば 60 mg) の lysozyme、ミクロスパーテル 1 ないし 2 杯分の DNase を加え、氷中で 30 min 攪拌した。攪拌後、French Press 3000psi (AMICO 社製) を用いて 140Mpa で三回破碎を行った。

第二項 無細胞抽出液画分、可溶性画分、膜画分における酸素代謝活性の比較

1. 試薬の調製

活性測定に必要な以下の試薬を調製する。特に記載の無い場合には Wako 社の特級試薬を用いた

【100 mM NADH solution】

NADH 100 mM (pH 無調整 Tris buffer)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{340} = 6,200$ を用いて濃度を算出する。

【100 mM NADPH solution】

NADPH 100 mM (pH 無調整 Tris buffer)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{340} = 6,220$ を用いて濃度を算出する。

【10 mM FAD solution】

FAD 10 mM (超純水)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{450} = 13,500$ を用いて濃度を算出する。

2. サンプルの調製

2-1. 無細胞抽出液の調製

同章 第一節 第一項 1 で得られた破碎液を $8,000 \times g$, 30 min, 4 °C で遠心分離した。上清を回収し無細胞抽出液を得た。

2-2. 可溶正確分の調製

得られた無細胞抽出液を $100,000\times g$, 2 h, 4 °C で遠心分離した。上清を回収し可溶性画分を得た。

2-3. 膜画分の調製

可溶性画分の調製の際に得られる沈殿に pH 7.0 50 mM Na-pi buffer を得られた可溶性画分と等量加え、氷中で完全にスターラー攪拌する (1 h 程度)。膜画分を得た。

3. NAD (P) H oxidase 活性測定

分光計 (HITACHI U-3310) を用いて 37 °C 条件下で pH 7.0 50 mM Na-pi buffer を加え、NAD (P) H, FAD をそれぞれ final 濃度で 150 μ M, 10 μ M となるように添加し、攪拌する。サンプルは 50 μ l 添加し NAD (P) H の減少量を測定する。測定液は 1 ml となるように調製した。活性は 1 分間あたりで 1 mg のタンパクあたりの NAD (P) H の減少量として算出した。測定は 3 回繰り返した。

4. 酸素吸収活性測定

溶存酸素検出は YSI MODEL 5300 Biological monitor (YSI 社) でレコーダーは UNICORDER U-228 (pantos 社) を使用した。37 °C 条件下で pH 7.0 50 mM Na-pi buffer を加え、NAD (P) H, FAD をそれぞれ final 濃度で 150 μ M, 10 μ M となるように添加した。測定液は 2.5 ml となるように調製した。活性値は 1 分間あたりで 1 mg のタンパクあたりの酸素の減少量として算出した。測定は 3 回繰り返した。

5. 結果

CFE において、FAD 非添加で NADH を電子供与体とした時の方が NADPH を電子供与体とした時よりも 6 倍活性高く、FAD 添加時においても同様であった。NADH を電子供与体としたときの Cytoplasm 画分が membren 画分に比べおよそ 3.5 倍活性が高かった (Table 3-1-1)。また、分光計と酸素電極それぞれで測定した活性値はおよそ同じ傾向を示していた (Table 3-1-2)。

Table 3-1-1. Oxygen metabolic activity in cytoplasm, membren and CFE.

	NADH		NADPH	
	Oxidase	Oxidase (10 μ M FAD)	Oxidase	Oxidase (10 μ M FAD)
Cytoplasm	563.9 (\pm 13.2)	872 (\pm 6.6)	59 (\pm 6.6)	104.9 (\pm 0.0)
Membren	157.4 (\pm 0.0)	229.5 (\pm 6.6)	98.4 (\pm 6.6)	78.7 (\pm 0.0)
CFE	642.6 (\pm 13.2)	996.6 (\pm 0.0)	104.9 (\pm 0.0)	150.8 (\pm 6.6)
CFE: Cell free extract			mU / ml sample (\pm SD)	

Table 3-1-2. Oxygen metabolic activity in cytoplasm, membren and CFE.

	Spectrometer		DO meter	
	NADH oxidase	NADH oxidase (10 μ M FAD)	NADH oxidase	NADH oxidase (10 μ M FAD)
Cytoplasm	560.0 (\pm 22.4)	917.9 (\pm 0.0)	368.3 (\pm 29.9)	577.3 (\pm 19.9)
Membren	111.0 (\pm 7.0)	124.6 (\pm 6.6)	49.8 (\pm 10.0)	99.5 (\pm 0.0)
CFE	623.5 (\pm 48.5)	1081.8 (\pm 98.3)	413.1 (\pm 4.9)	711.7 (\pm 14.9)
				mU / ml sample (\pm SD)

第三項 Butyl TOYOPEARL 650S を用いた酵素分画

1. 試薬の調製

以下の試薬を調製する。特に記載の無い場合は Wako 純薬製の試薬を用いた。

【PMSF solution】

PMSF	200 mM (Et-OH)
------	----------------

【ストレプトマイシン硫酸塩】

ストレプトマイシン硫酸塩	10 % (pH 8.0 50 mM Tris buffer)
--------------	---------------------------------

【100 mM NADH solution】

前項に準じて作製する。

【100 mM NADPH solution】

前項に準じて作製する。

【10 mM FAD solution】

前項に準じて作製する。

2. 菌体破碎、脱核酸、硫酸アンモニウム沈殿処理

菌体を解凍し、完全に溶けきる前に倍量の buffer を加え懸濁する。菌体重量 $\times 1/1000$ 量 (60 g の菌体であれば 60 mg) の lysozyme、ミクロスペーテル 1 ないし 2 杯分の DNase を加え、氷中で 30 min 攪拌した。攪拌後、French Press 3000psi (AMICO 社製) を用いて 140Mpa で三回破碎を行った。一回目の破碎後、PMSF 破碎液に対して $1/200$ 量添加し 10 min 攪拌する。二回目の破碎後に PMSF を破碎液に対して $1/200$ 量添加し、同様の操作後に三回目の破碎を行った。破碎後 $8,000 \times g$, 20 min, 4 °C で遠心分離、上清を回収し無細胞抽出液を得た。再び $100,000 \times g$, 2 h, 4 °C で遠心分離した。上清を回収し可溶性画分を得た。可溶性画分をメスシリンダーで正確に計量し、 $1/3$ 量のストレプトマイシン硫酸塩を滴々と加え、NaOH を用いて pH を 7.0 に調整し 30 min 攪拌した。以上の操作はすべて氷中で行った。攪拌後、 $16,800 \times g$, 30 min 遠心し上清を得た (脱

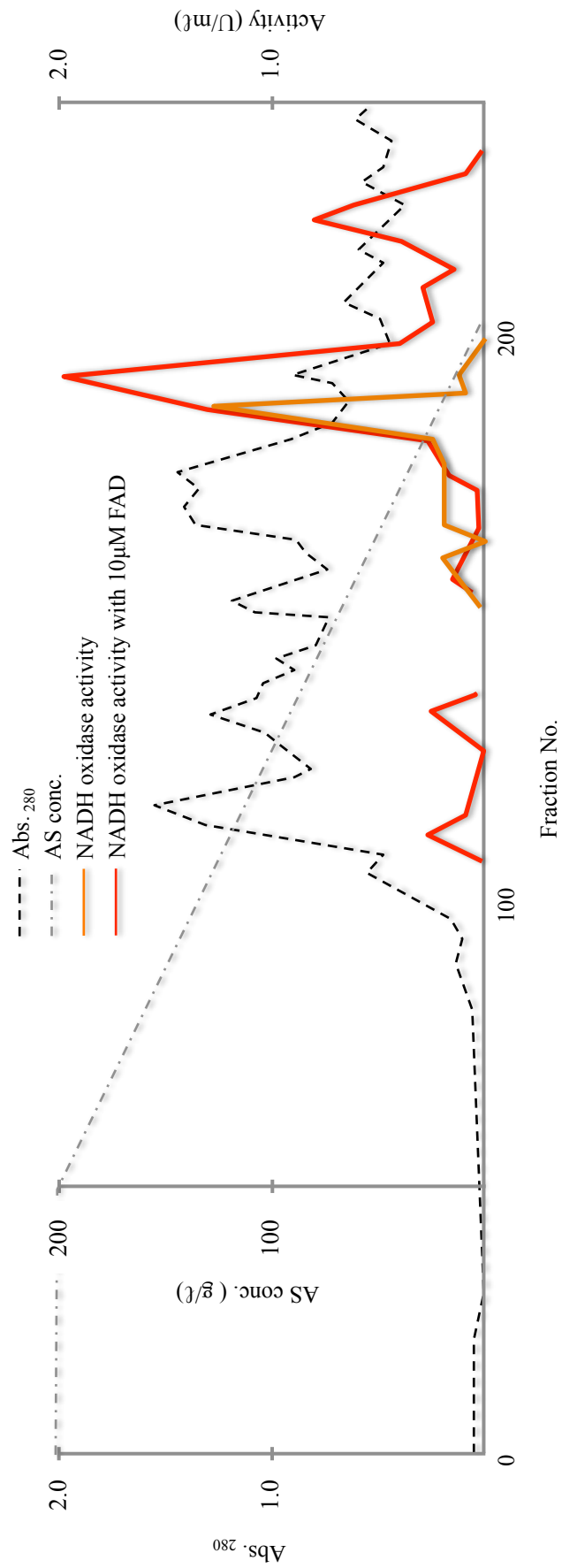
核酸)。上清をメスシリンダーで正確に計量し、200 g / ℓとなるように硫酸アンモニウム（事前にすり鉢で搗ったもの）を少しずつ添加し、NH₃でpHを7.0に調整し30 min 攪拌した。以上の操作も氷中で行う。攪拌後69,700×g, 30minで遠心分離し、上清を回収（硫酸アンモニウム沈殿）し、粗酵素液を得た。

3. Butyl TOYOPEARL 650S による酵素分画

得られた粗酵素液を pH 7.0 50 mM Na-pi buffer (AS 200 g / ℓ) で平衡化した Butyl TOYOPEARL 650S に供し、同 buffer で洗浄後、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer (AS 200 g / ℓ) から pH 7.0 50 mM Na-pi buffer (AS 0 g / ℓ) で liner gradient elution を行い、Foxy 200TM X-Y Fraction collector により溶出画分をワッセルマンに回収した。カラムクロマトチャートを Figure 3-1-2 に示す。

4. 10 μM FAD 存在下での活性測定

pH 7.0 50 mM Na-pi を用いて、NADH, FAD をそれぞれ終濃度 150 μM, 10 μM となるように調製し、測定液の総量は 1 ml とした。各フラクションサンプルは 50～100 μℓ 添加し、活性値はサンプル 1 ml あたり、一分間の NADH の減少量を NADH の分子吸光係数（ $\epsilon_{340} = 6,200$ ）を基に算出した。各フラクションに対する活性測定の結果を Figure 3-1-2 に示す。



F Figure 3-1-2. Column chromatography of 1st column Butyl TOYOPEARL 650S

5. 活性を有する画分の分画と透析

活性を示した画分を A～E の 5 画分に分割し (Figure 3-1-3)、それぞれをまとめ、pH 7.0 20 mM Na-pi (15 μ M FAD, 1mM EDTA) , 4°C条件下で透析処理を 4 時間×3 回行った。透析膜は 10,000 cut off (三光純薬株式会社) を用い、透析中は 30 分毎に上下攪拌を行った。

6. 分割画分の 10 μ M FAD 存在下での NADH oxidase 活性測定

活性測定方法は同項 4 に準じて行った。活性測定の結果を Table 3-1-3 に示す。

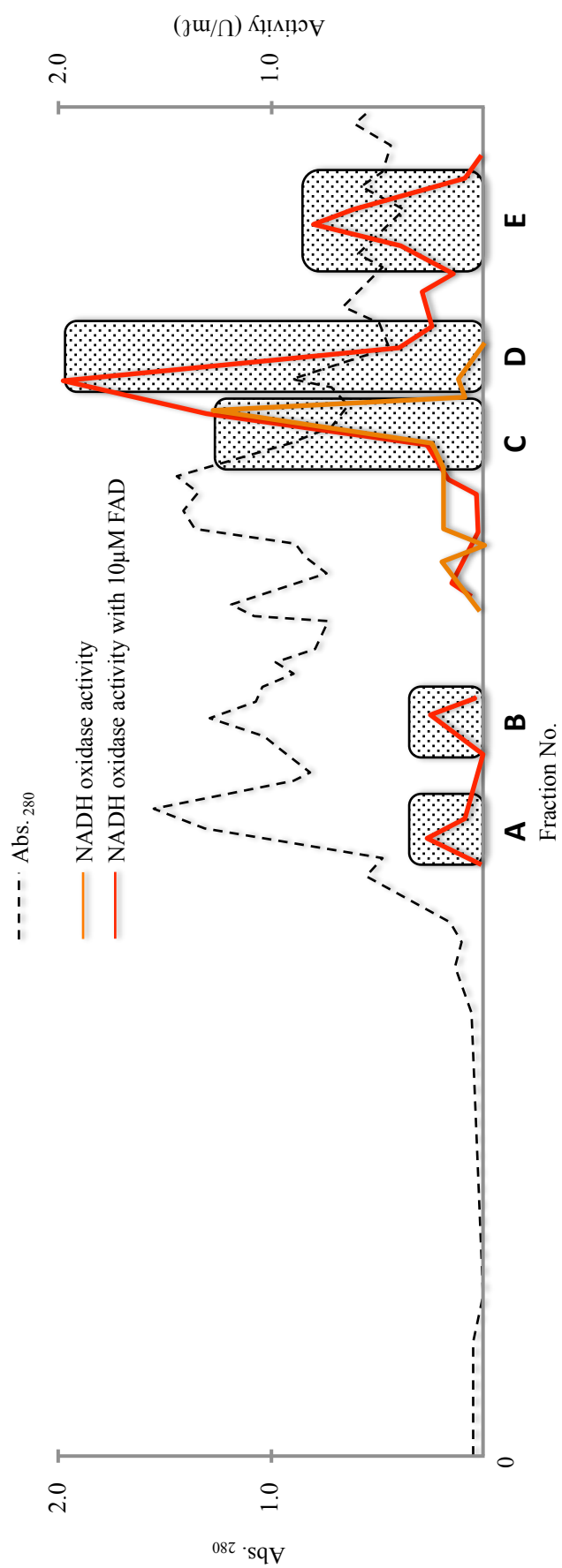


Figure 3-1-3. Column chromatogram of 1st column Butyl TOYOPEARL 650S.

Table 3-1-3. The activity of each fractions showing high activity in 1st column.

		A	B	C	D	E
Activity(U)	Spectrometer	16.5	10.6	136.4	76.4	17.9
	DO meter	8.1	5.8	74.4	27.6	13.0
	Rate(%)	5.8	4.1	53.1	27.6	9.6

8. 結果

Butyl TOYOPEARL 650S での酵素分画の結果、少なくとも 5 つの遊離フラビンを利用した酸素代謝酵素の存在を明らかにした。C 画分はこれまでの生化学的な解析の結果 Nox であることが推定される。Nox であることが推定される C 画分と次に強い D 画分を合わせると全体の 80 %程度の活性を示すことから、この二つの酵素が *A. xylanus* の遊離フラビンが関与する酸素代謝活性の主要な構成要素であることが推察される。D 画分に含まれる酵素が不明であることから、D 画分の更なる精製を試みた。

第四項 生理的遊離フラビン濃度下で酸素代謝活性を示す酵素の精製

1. 2nd column DEAE sephacel

同章 第一節 第三項 5 でまとめた画分のうち、D 画分を透析後、69,700×g, 30 min 4 °Cで遠心し上清を回収した。この上清を pH 7.0 20 mM Na-pi buffer で平衡化した DEAE sephacel に供した。同 buffer で洗浄後 pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml → pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl) **liner gradient elution**, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl)buffer 150 ml **step elution**, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl)buffer → pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (250 mM NaCl)buffer, **liner gradient elution**, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (250 mM NaCl)buffer **step elution**, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (500 mM NaCl), **step elution** でタンパク質を溶出させ、Foxy 200TM X-Y Fraction collector により溶出画分をワッセルマンに回収した。各フラクションに対し 10 μM FAD 存在下での NADH oxidase 活性を測定し、画分を選定した。

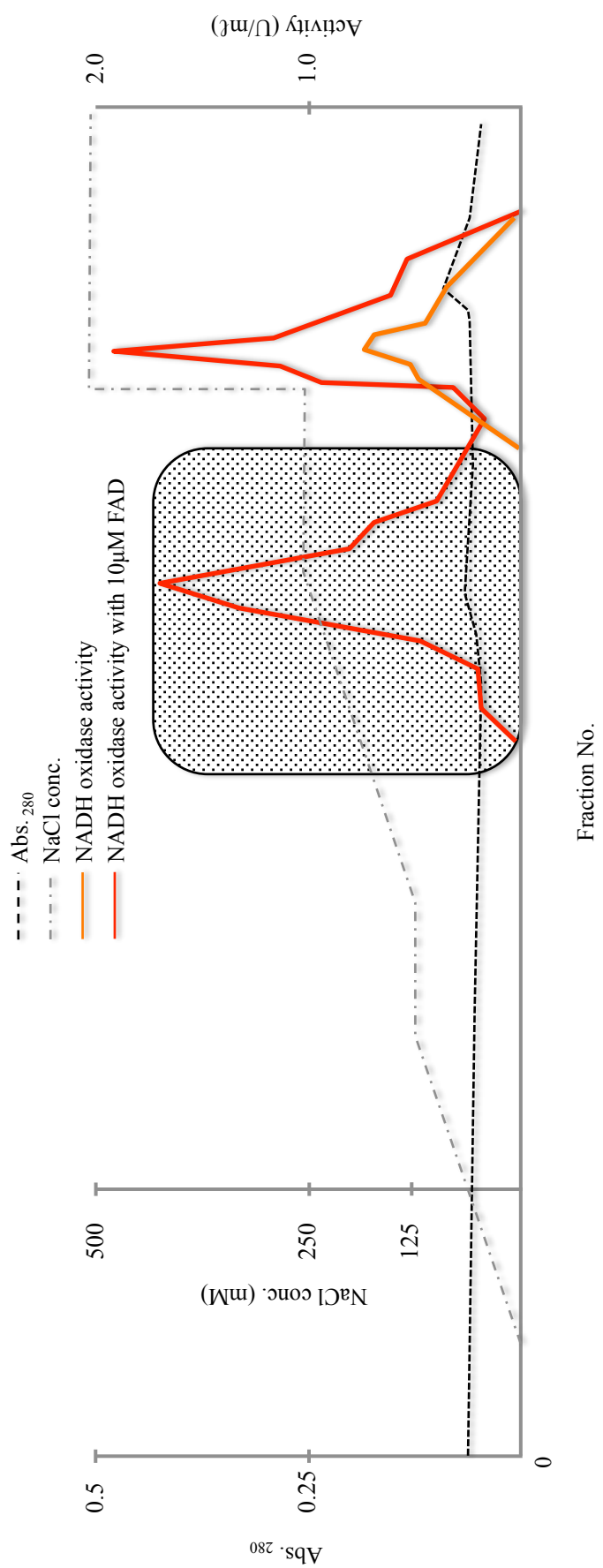


Figure 3-1-4. Column chromatogram of 2nd column DEAE sephacel.

2. 3rd column POROS HQ / 10

EAE sephacel で選定した画分を Apollo High-Performance Centrifugal Concentrators MWCO 20kDa (Orbital Biosciences 社)にて濃縮した。濃縮は 5 ml 以下になるまで行った。濃縮後、buffer を加え再び濃縮を繰り返し、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer にて置換を行った (1 / 1,000 希釈以上)。濃縮した画分を pH 7.0 20 mM Na-pi buffer で平衡化した POROS HQ / H に供し、同 buffer で洗浄後、

pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml → pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl) liner gradient elution, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl) buffer 150 ml step elution, pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (125 mM NaCl) buffer → pH 7.0 20 mM Na-pi buffer 150 ml (250 mM NaCl) buffer liner gradient elution でタンパク質を溶出させ溶出画分をワッセルマンに回収した。各フラクションに対し 10 μ M FAD 存在下での NADH oxidase 活性測定と SDS PAGE を行い、目的の画分を選定した。なお、HQ / 10 のクロマトグラフィーにはパーフュージョンクロマトグラフィーシステムを用いている。

3. 精製結果と目的タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析、BLAST 解析

以上の精製行程により目的酵素の精製に成功した (Figure 3-1-5)。目的タンパク質は SDS PAGE により単量体分子量は約 25 kDa で N 末端アミノ酸配列分析より MAKDFYQAVKD で、ゲノム上の NAD (P) H oxidoreductase (NPO) と一致した。本酵素は BLAST 解析 (Table 3-1-4)、Inter Pro scan によるモチーフ解析 (Figure 3-1-6) の結果 nitro reductase family に属する機能未知酵素であった。

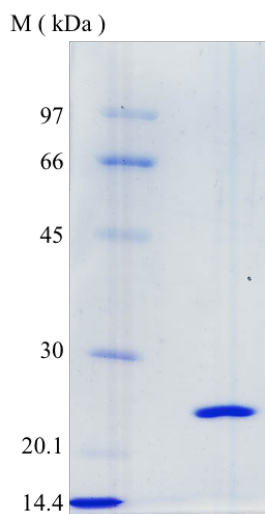


Figure 3-1-5. SDS PAGE of target protein.

Table 3-1-4. BLAST analysis of
NPO

Ra					E-val	Sco	Ident
nk	species	Accession	Product	Gene	ue	re	ity
		Q4MHR9_BA		BCE_G9241_	3.00E-		
1	<i>Bacillus cereus G9241</i>	CCE	Nitroreductase family protein	1963	75	283	66%
		Q739V2_BAC			6.00E-		
2	<i>Bacillus cereus</i>	C1	Putative uncharacterized protein	BCE_2035	74	279	65%
		Q63CK4_BA			3.00E-		
3	<i>Bacillus cereus</i>	CCZ	Nitroreductase family protein	BCE33L1768	73	277	65%
		A9VQR7_9B		BcerKBAB4_	3.00E-		
4	<i>Bacillus weihenstephanensis KBAB4</i>	ACI	Nitroreductase	1819	73	277	64%
		A0RCV9_BA			3.00E-		
5	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CAH	Nitroreductase family protein	BALH_1728	73	277	65%
	<i>Bacillus thuringiensis subsp.</i>	Q6HK09_BA			8.00E-		
6	<i>konkukian</i>	CHK	Nitroreductase family protein	BT9727_1785	73	275	64%
		Q81EL7_BAC			2.00E-		
7	<i>Bacillus cereus</i>	CR	Nitroreductase family protein	BC_1952	72	274	64%
		B0APK3_BA			2.00E-		
8	<i>Bacillus anthracis str. A0488</i>	CAN	Putative uncharacterized protein	BAC_1972	72	274	64%
				BAS1811			
		Q81RT6_BAC			2.00E-		
9	<i>Bacillus anthracis</i>	AN	Putative uncharacterized protein	BA_1951	72	274	64%
				GBAA1951			
		Q4V195_BAC		pE33L466_03	6.00E-		
10	<i>Bacillus cereus</i>	CZ	Possible nitroreductase family protein	69	71	269	63%
		A6LTH0_CL			5.00E-		
11	<i>Clostridium beijerinckii</i>	OB8	Nitroreductase family protein	Cbei_1472	70	266	61%
		Q97E06_CLO			2.00E-		
12	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AB	Nitroreductase family protein	CA_C3314	69	264	61%
		A7GFD9_CL			3.00E-		
13	<i>Clostridium botulinum</i>	OBL	Putative uncharacterized protein	CLI_2249	69	263	60%
14	<i>Clostridium botulinum</i>	A7FVM0_CL	Putative uncharacterized protein	CLB_2143	2.00E-	261	60%

		OB1			68		
		A5I3X5_CLO			2.00E-		
15	<i>Clostridium botulinum</i>	BH	Putative uncharacterized protein	CBO2204	68	261	60%
		A0UVQ3_CL		CcelDRAFT_	2.00E-		
16	<i>Clostridium cellulolyticum H10</i>	OCE	Nitroreductase	2269	66	254	57%
	<i>Bacillus thuringiensis subsp. konkukian</i>	Q6HG31_BA			2.00E-		
17		CHK	Putative uncharacterized protein	BT9727_3172	66	254	60%
		Q638I1_BAC			2.00E-		
18	<i>Bacillus cereus</i>	CZ	Putative uncharacterized protein	BCE33L3099	66	254	60%
		Q4MXV2_BA		BCE_G9241_	3.00E-		
19	<i>Bacillus cereus G9241</i>	CCE	Nitroreductase family protein	3338	66	253	60%
		Q81B06_BAC			7.00E-		
20	<i>Bacillus cereus</i>	CR	Nitroreductase family protein	BC_3390	66	252	59%
		B0ALN5_BA			6.00E-		
21	<i>Bacillus anthracis str. A0488</i>	CAN	Putative uncharacterized protein	BAC_3459	65	249	59%
				BAS3191			
		Q81MX6_BA			3.00E-		
22		CAN	Putative uncharacterized protein	BA_3444	64	247	58%
				GBAA3444			
		A5N6Y6_CL			8.00E-		
23	<i>Clostridium kluyveri</i>	OK5	Predicted oxidoreductase	CKL_1025	62	239	56%
		Q5WJY1_BA			1.00E-		
24	<i>Bacillus clausii</i>	CSK	Putative uncharacterized protein	ABC0785	61	238	57%
		A1HNNH2_9FI		TcarDRAFT_	3.00E-		
25	<i>Thermosinus carboxydvorans Nor1</i>	RM	Putative nitroreductase family protein	2281	60	233	55%
		Q8Y3K6_LIS			2.00E-		
26	<i>Listeria monocytogenes</i>	MO	Lmo2829 protein	lmo2829	58	227	53%
		A4E699_LIS			2.00E-		
27	<i>Listeria monocytogenes HPB2262</i>	MO	Putative uncharacterized protein	LMSG_00251	58	227	53%
		A4DQN4_LIS			2.00E-		
28	<i>Listeria monocytogenes FSL N3-165</i>	MO	Putative uncharacterized protein	LMIG_00246	58	227	53%
		A4DY14_LIS		LMMG_0167	2.00E-		
29	<i>Listeria monocytogenes F6900</i>	MO	Putative uncharacterized protein	6	58	227	53%

		A3G696_LIS			2.00E-			
30	<i>Listeria monocytogenes</i> J2818	MO	Putative uncharacterized protein	LMPG_00073	58	227	53%	
		A3GC06_LIS			2.00E-			
31	<i>Listeria monocytogenes</i> 10403S	MO	Putative uncharacterized protein	LMRG_01869	58	227	53%	
		A3FTF5_LIS			2.00E-			
32	<i>Listeria monocytogenes</i> J0161	MO	Putative uncharacterized protein	LMOG_00982	58	227	53%	
		Q71VT2_LIS		LMOF2365_28	2.00E-			
33	<i>Listeria monocytogenes</i> serotype 4b	MF	Putative uncharacterized protein	20	58	227	53%	
		A4DI37_LIS			2.00E-			
34	<i>Listeria monocytogenes</i> FSL N1-017	MO	Putative uncharacterized protein	LMHG_00533	58	227	53%	
		Q926S9_LISI			2.00E-			
35	<i>Listeria innocua</i>	N	Lin2962 protein	lin2962	58	227	53%	
		Q9I0R1_PSE			4.00E-			
36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AE	Putative uncharacterized protein	PA2575	58	226	56%	
		A3LAQ2_PSE			4.00E-			
37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2192	AE	Putative uncharacterized protein	PA2G_01688	58	226	56%	
		A3KUX2_PS			4.00E-			
38	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C3719	EAE	Putative uncharacterized protein	PACG_01488	58	226	56%	
		Q5LIQ8_BAC			6.00E-			
39	<i>Bacteroides fragilis</i>	FN	Putative uncharacterized protein	BF0191	58	226	57%	
		Q64ZU5_BA			6.00E-			
40	<i>Bacteroides fragilis</i>	CFR	Nitroreductase	BF0232	58	226	57%	
		A0AME5_LIS			6.00E-			
41	<i>Listeria welshimeri</i> serovar 6b	W6	Complete genome	lwe2759	58	226	53%	
		A9I2P5_9BA		EminDRAFT_	5.00E-			
42	<i>Elusimicrobium minutum</i> Pei191	CT	Nitroreductase	1470	57	223	53%	
		Q02N66_PSE			5.00E-			
43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB	Putative nitroreductase	PA14_30800	57	223	54%	
		A6V4L7_PSE			6.00E-			
44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A7	Putative uncharacterized protein	PSPA7_2641	57	223	54%	
		Q6D3A6_ER			3.00E-			
45	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	WCT	Putative uncharacterized protein	ECA2838	56	220	51%	
		A7LVR5_BA		BACOVA_01	2.00E-			
46	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	COV	Putative uncharacterized protein	916	55	218	54%	

		A6L9U8_PAR			1.00E-			
47	<i>Parabacteroides distasonis</i>	D8	Nitroreductase	BDI_0691	54	215	51%	
		A3I7R4_9BA		BB14905_052	1.00E-			
48	<i>Bacillus sp. B14905</i>	CI	Putative uncharacterized protein	23	54	215	48%	
		Q8A2B3_BA			2.00E-			
49	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	CTN	Nitroreductase	BT_3392	54	214	53%	
		A5ZFC9_9BA		BACCAC_01	8.00E-			
50	<i>Bacteroides caccae ATCC 43185</i>	CE	Putative uncharacterized protein	593	54	212	53%	
		A4SJY1_AER			1.00E-			
51	<i>Aeromonas salmonicida</i>	S4	Putative uncharacterized protein	ASA_1081	53	212	50%	
	<i>Aeromonas hydrophila subsp.</i>	A0KN73_AE			2.00E-			
52	<i>hydrophila</i>	RHH	Nitroreductase family protein	AHA_3233	53	211	49%	
		A6X4T1_OC			3.00E-			
53	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	HA4	Putative uncharacterized protein	Oant_3529	53	210	52%	
		A6S727_BOT			3.00E-			
54	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	FB	Putative uncharacterized protein	BC1G_08602	53	210	49%	
		Q3IH76_PSE			4.00E-			
55	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	HT	Putative uncharacterized protein	PSHAa1751	53	210	52%	
		Q6FA32_ACI			9.00E-			
56	<i>Acinetobacter sp.</i>	AD	Putative uncharacterized protein	ACIAD2295	53	209	48%	
		A7AEN2_9PO		PARMER_01	9.00E-			
57	<i>Parabacteroides merdae ATCC 43184</i>	RP	Putative uncharacterized protein	872	53	209	51%	
		A9MBE0_BR			2.00E-			
58	<i>Brucella canis ATCC 23365</i>	UCA	Putative uncharacterized protein	BCAN_B0498	52	207	51%	
		Q577Q3_BRU			2.00E-			
59	<i>Brucella abortus</i>	AB	Putative uncharacterized protein	BruAb2_0725	52	207	51%	
		Q2YKC2_BR			2.00E-			
60	<i>Brucella abortus</i>	UA2	Putative uncharacterized protein	BAB2_0740	52	207	51%	
		A5VUG4_BR			2.00E-			
61	<i>Brucella ovis</i>	UO2	Putative uncharacterized protein	BOV_A0433	52	207	51%	
		Q8FWF8_BR			2.00E-			
62	<i>Brucella suis</i>	USU	Putative uncharacterized protein	BRA0497	52	207	51%	
		Q8YBW4_BR			2.00E-			
63	<i>Brucella melitensis</i>	UME	Hypothetical Cytosolic Protein	BMEII0772	52	207	51%	

		A9WYH6_BR			2.00E-			
64	<i>Brucella suis</i>	USI	Putative uncharacterized protein	BSUIS_B0496	52	207	51%	
		A1IU18_NEI			5.00E-			
65	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	MA	Putative uncharacterized protein	NMA2195	52	206	49%	
		Q7AX12_NEI	Putative uncharacterized protein		5.00E-			
66	<i>Neisseria meningitidis</i>	ME	ycl026c-a	ycl026c-a	52	206	49%	
		A7V058_BAC		BACUNI_009	5.00E-			
67	<i>Bacteroides uniformis</i> ATCC 8492	UN	Putative uncharacterized protein	43	52	206	51%	
		Q9K178_NEI			6.00E-			
68	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B	MB	Putative uncharacterized protein	NMB0292	52	206	48%	
	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C /	A1KVZ6_NEI			6.00E-			
69	serotype 2a	MF	Putative uncharacterized protein	NMC1889	52	206	48%	
		A3M612_ACI			1.00E-			
70	<i>Acinetobacter baumannii</i>	BT	Putative oxidoreductase	A1S_1929	51	205	49%	
		Q2KWX9_BO			1.00E-			
71	<i>Bordetella avium</i>	RA1	Putative uncharacterized protein	BAV0744	51	205	49%	
		A9M323_NEI			2.00E-			
72	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C	M0	Putative uncharacterized protein	NMCC_1854	51	204	48%	
		A5WHV4_PS	Oxidoreductase related to	PsycPRwf_23	2.00E-			
73	<i>Psychrobacter</i> sp.	YWF	nitroreductase-like protein	05	51	204	52%	
		A6L0S7_BAC			3.00E-			
74	<i>Bacteroides vulgatus</i>	V8	Nitroreductase	BVU_1605	51	204	51%	
		Q3XZV6_EN		EfaeDRAFT_	5.00E-			
75	<i>Enterococcus faecium</i> DO	TFC	Nitroreductase	1024	51	203	48%	
		A7EWA6_SC			5.00E-			
76	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	LS1	Putative uncharacterized protein	SS1G_09615	51	203	49%	
		A9HYQ7_9B			5.00E-			
77	<i>Bordetella petrii</i>	ORD	Putative uncharacterized protein	Bpet3518	51	203	52%	
			Putative uncharacterized protein	B9B15.090				
78		Q9HE35_NE	B9B15.090	NCU03696	7.00E-	202	51%	
		UCR			51			
			Putative uncharacterized protein	NCU03696.1				
79	<i>Comamonas</i> sp. CNB-1	A7K7L3_9BU	Predicted oxidoreductase		1.00E-	202	51%	

		RK			50		
	<i>Staphylococcus saprophyticus subsp.</i>	Q49YY9_STA			1.00E-		
80	<i>saprophyticus</i>	S1	Nitroreductase family protein	SSP0844	50	201	46%
		A8UAQ9_9L			1.00E-		
81	<i>Carnobacterium sp. AT7</i>	ACT	Putative uncharacterized protein	CAT7_11650	50	201	50%
		Q838B7_ENT			1.00E-		
82	<i>Enterococcus faecalis</i>	FA	Nitroreductase family protein, putative	EF_0655	49	198	49%
		A3M945_ACI			2.00E-		
83	<i>Acinetobacter baumannii</i>	BT	Putative oxidoreductase	A1S_3042	49	197	47%
		Q99SL4_STA	Similar to nitroreductase family		3.00E-		
84	<i>Staphylococcus aureus</i>	AM	protein	SAV2033	49	197	48%
		A5IUI0_STA			3.00E-		
85	<i>Staphylococcus aureus</i>	A9	Nitroreductase	SaurJH9_2070	49	197	48%
		Q7A4J0_STA	Putative uncharacterized protein		3.00E-		
86	<i>Staphylococcus aureus</i>	AN	SA1840	SA1840	49	197	48%
		A7X4J7_STA			3.00E-		
87	<i>Staphylococcus aureus</i>	A1	Putative uncharacterized protein	SAHV_2018	49	197	48%
		A6U3B9_STA			3.00E-		
88	<i>Staphylococcus aureus</i>	A2	Nitroreductase	SaurJH1_2107	49	197	48%
		A6QIN1_STA			4.00E-		
89	<i>Staphylococcus aureus</i>	AE	Putative uncharacterized protein	NWMN_1941	49	197	48%
		Q5HEG8_ST			4.00E-		
90	<i>Staphylococcus aureus</i>	AAC	Putative uncharacterized protein	SACOL2020	49	197	48%
		A8Z4T6_STA		USA300HOU	4.00E-		
91	<i>Staphylococcus aureus</i>	AT	Possible nitroreductase	_2028	49	197	48%
		Q6G7S4_STA			4.00E-		
92	<i>Staphylococcus aureus</i>	AS	Putative uncharacterized protein	SAS1939	49	197	48%
		Q2FWN0_ST		SAOUHSC_0	4.00E-		
93	<i>Staphylococcus aureus</i>	AA8	Putative uncharacterized protein	2258	49	197	48%
		Q2YUD4_ST			4.00E-		
94	<i>Staphylococcus aureus</i>	AAB	Probable nitroreductase family protein	SAB1917	49	197	48%
		Q2FF91_STA		SAUSA300_1	4.00E-		
95	<i>Staphylococcus aureus</i>	A3	Nitroreductase family protein	986	49	197	48%
96	<i>Staphylococcus aureus</i>	Q8NVK8_ST	Putative uncharacterized protein	MW1957	4.00E-	197	48%

		AAW	MW1957		49		
		A4SEE2_PRO			8.00E-		
97	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	VI	Nitroreductase family protein	Cvib_0836	49	196	48%
		Q4L7R8_STA			1.00E-		
98	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	HJ	Nitroreductase family protein homolog	SH0998	48	195	46%
		A0RCT1_BA			1.00E-		
99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CAH	Nitroreductase family protein	BALH_1699	48	195	47%
		Q4FQT3_PSY			1.00E-		
100	<i>Psychrobacter arcticum</i>	AR	Putative uncharacterized protein	Psyc_1777	48	195	49%

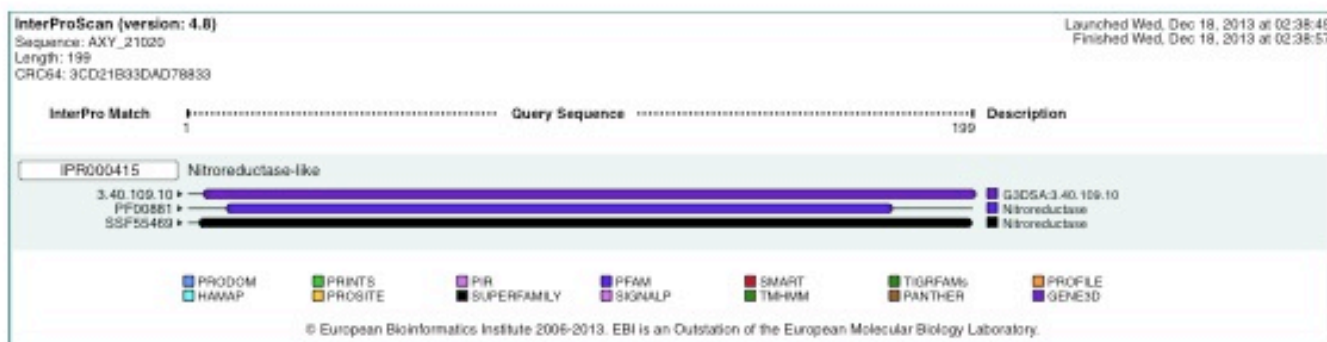


Figure 3-1-6. Motif search of NPO.

第二節 NPO の発現系構築と rNPO の精製

第一項 発現系構築

1. NPO 遺伝子産物の増幅

A. xylanus ゲノム上の NPO 遺伝子配列を基に primer を作製した。Forward: CACCATGGCAAAAGATTTT, Reverse: TTATTTAAAATTTTCACAC. PCR には PrimeSTARTM HS DNA polymerase (TaKaRa 社) を用いた。Table 3-2-1 を参照に試薬を調製し、Figure 3-2-1 条件で PCR を行い、約 600 kbp の 遺伝子産物を 得た (Figure 3-2-2)。

Table 3-2-1. Composition of PCR for NPO probe.

	Add. vol. (μl)
50 nh / μl DNA from <i>A. xylanus</i>	1
10 pM Forward primer	1
10 pM Reverse primer	1
dNTPs mixture	4
PrimeSTAR TM HS DNA polymerase	0.2
5×PrimeSTAR TM buffer	10
MiliQ	33
Total vol.	50

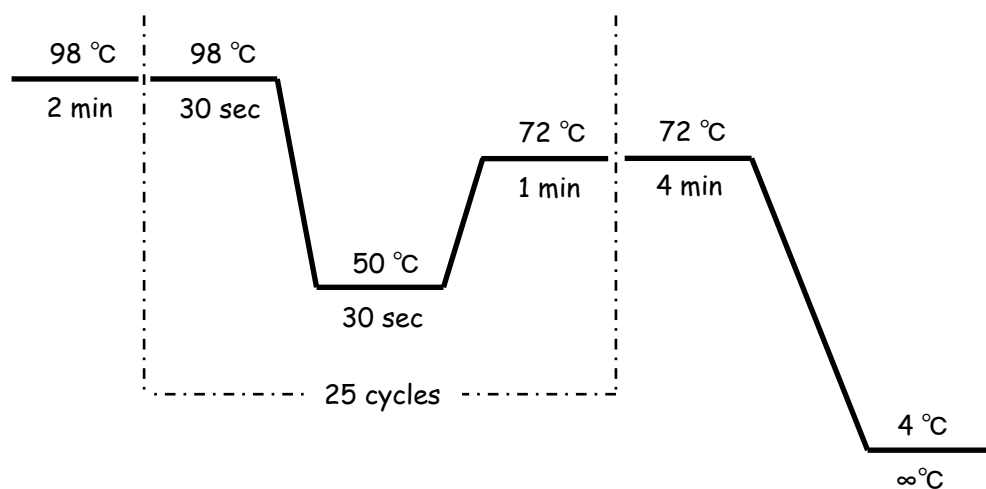


Figure 3-2-1. The PCR condition.

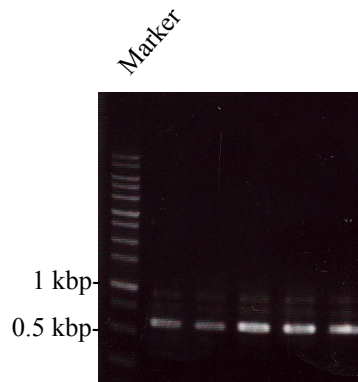


Figure 3-2-2. Amplified product gene, *npo*.

2. TOPO クローニングと BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] *E. coli* への TF

増幅した遺伝子産物を QIA quick[®] Gel Extraction kit を用いて精製し、pET101/D-TOPO vector (invitrogen 社 Figure 3-2-3) へクローニングした。クローニングから TF までの手法は invitrogen 社の User Manual

(http://xray.bmc.uu.se/Courses/MPC/literature_files/pettopo_man.pdf) を参照する。

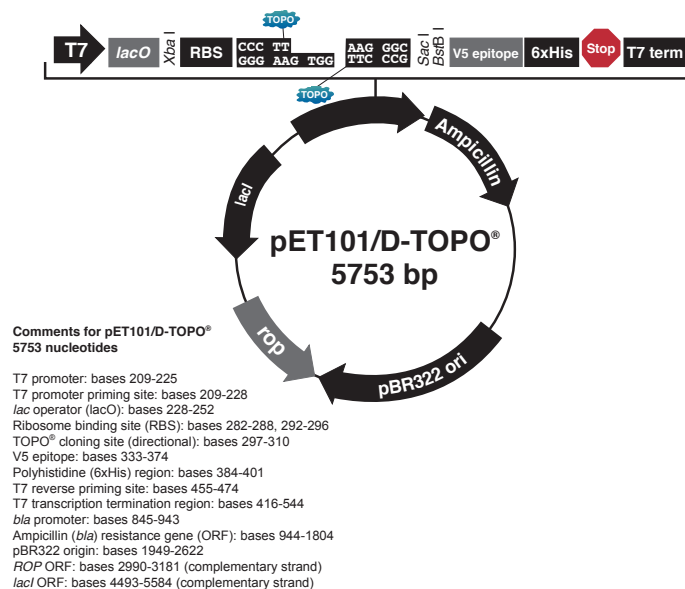


Figure 3-2-3. General information of pET101/D-TOPO vector.

3. 挿入配列のシーケンス

DE3 への TF 後にインサート配列のシーケンスを行い、目的配列が正確に挿入されていることを確認した。シーケンスの手法は木俣真弥修士論文[24]を参照する。配列の正確性が確認できたものからグリセロールストックを作製し-80 °C で保存した。

4. IPTG 検討

4-1. LB 培地 (Amp⁺) の調製

第二章 第一節 第一項 1 に準じて培地を調製する。オートクレーブ後に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Ampicilline を添加する。

4-2. rNPO 発現株の培養

グリセロールストックより 3 ml LB 培地 (Amp⁺) に 1 白金ドリル植菌し、37 °C, 160 rpm で培養する。生育を目視で確認し、同培地へ植菌し、37 °C, 160 rpm で培養する。OD \simeq 0.5 付近で IPTG を終濃度 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM となるように添加し、3 h 培養する。集菌し、SDSPAGE へ供した (Figure 3-2-4)。IPTG の添加による発現の誘導を観察できたため、rNPO 発現株の作製に成功した。

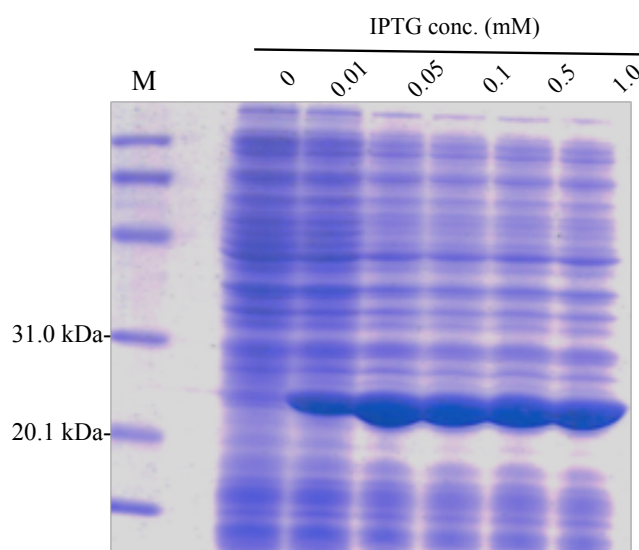


Figure 3-2-4. SDSPAGE of induced rNPO by IPTG.

第二項 rNPO の精製と抗体作製

1. rNPO 発現株の大量培養

1-1. LB 培地 (Amp⁺) の作製

二章 第一節 第一項 1 に準じて培地を調製する。オートクレーブ後に 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Ampicilline を添加する。

1-2. 培養、集菌

グリセロールストックから 3 ml LB 培地へ 1 白金ドリル植菌する。37 °C で培養し、同培地を用いて 3 ml, 100 ml / 500 ml 三角フラスコ, 2 l / 5 l 三角フラスコとスケールアップした。前項 IPTG 検討を参照に IPTG を添加し、全量を 8,000 rpm 3 min RT (BECKMAN Avanti™ HP-25 Roter ID JA10.5) で素早く集菌した。集菌後 pH 7.0 50 mM Na-pi buffer で 3 回菌体をウォッシュした。菌量測定後、菌体量に対して 2 倍量の同 buffer で懸濁し、液体窒素を用いて急凍後使用まで -80 °C で保存した。

2. rNPO の精製

2-1. 粗酵素液の調製

同章 第一節 第三項 2 に準じて粗酵素液を調製した。

2-2. 精製

同章 第一節 第三、四項に準じて rNPO を精製した。SDSPAGE のバンドサイズを精製の指標とした。

3. 抗体作製

精製酵素を 1.0 mg / ml: 1.5 ml に調製し、有限会社 ジャパンラムへ抗体作製を依頼した。rNPO のポリクローナル抗体を得た。作製期間は 2 ヶ月程度を要する。

第三節 rNPO の酵素学的諸性質解析

第一項 至適 pH、至適温度、活性の安定性の検討

1. 試薬の調製

NADH, FAD の調製方法は、同章 第一節 第二項 1 を参照する。

2. 活性測定

2-1. 至適 pH の検討

10 μ M FAD 存在下の NADH oxidase 活性を指標にした。活性測定法は、同章 第一節 第二項 3 を参照する。pH 3～6: Citrate buffer, pH 6～8: Napi buffer, pH 8～9: Tris-HCl buffer, pH 9～11: CO₃ buffer を用いて活性を測定した (Figure 3-3-1)。

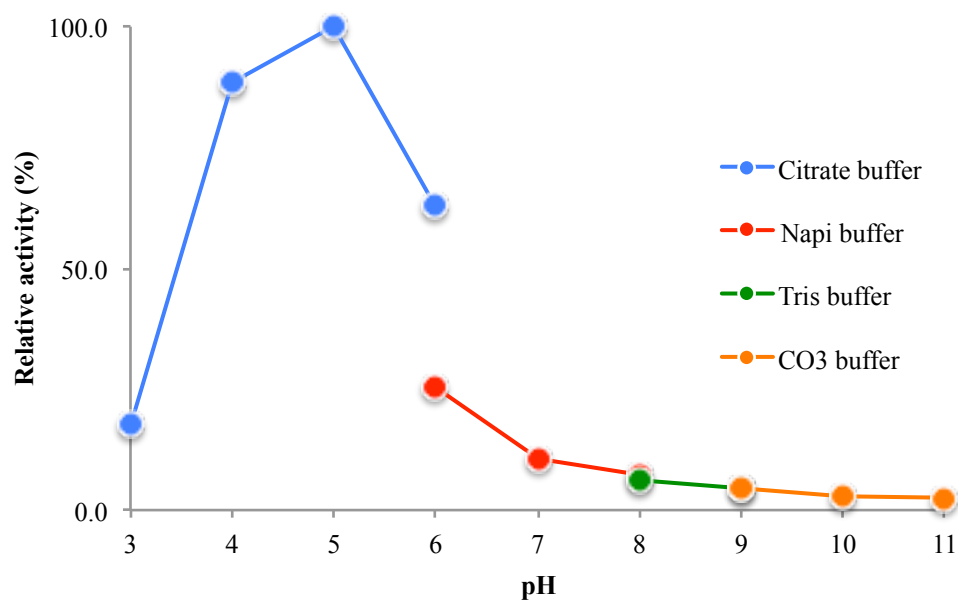


Figure 3-3-1. NADH oxidase activity with FAD of NPO under pH 3 to 11.

2-2. 10 μ M FAD 存在下の NADH oxidase 活性を指標にした。活性測定法は、同章 第一節 第二項 3 を参照する。10～65 $^{\circ}$ C まで活性を測定した (Figure 3-3-2)。

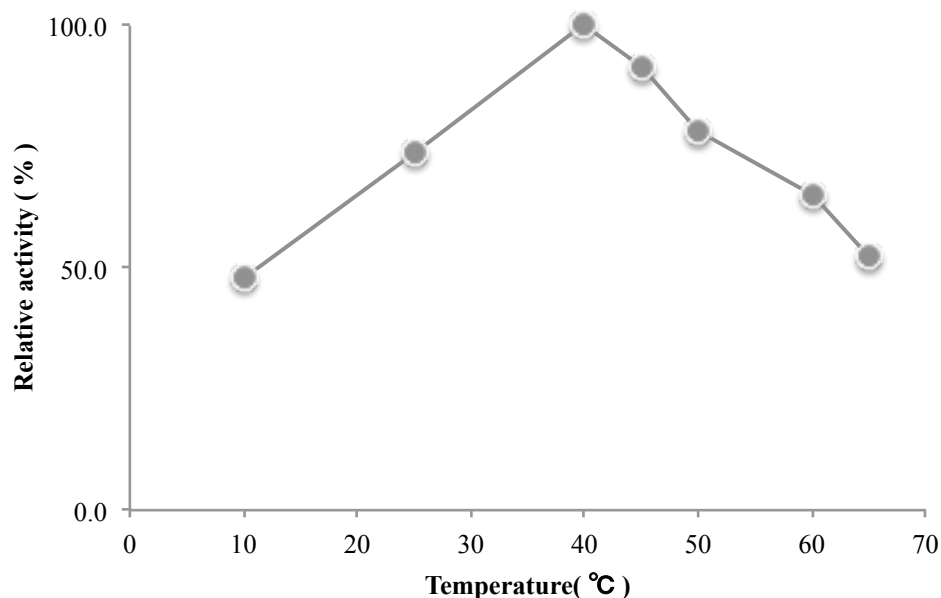


Figure 3-3-2. NADH oxidase activity with FAD of NPO under 10 to 65 $^{\circ}$ C.

2-3. 活性の安定性の検討

10 μ M FAD 存在下の NADH oxidase 活性を指標にした。活性測定法は、同章 第一節 第二項 3 を参照する。

第二項 基質特異性の検討

1. 試薬の調製

NADH, FAD の調製方法は、同章 第一節 第二項 1 を参照する。

以下の試薬を調製する。記載の無い場合には Wako 純薬製のものをを用いた。

【10 mM FMN solution】

FMN 10 mM (MiliQ)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{450} = 12,200$ を用いて濃度を算出する。

【10 mM Riboflavin solution】

Riboflavin 10 mM (MiliQ)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{445} = 12,500$ を用いて濃度を算出する。

【10 mM DCIP solution】

DCIP 10 mM (MiliQ)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{600} = 18,500$ を用いて濃度を算出する。

【10 mM Menadione solution】

Menadione 10 mM (超純水)

【10 mM Nitrofrazon solution】

Nitrofrazone 10 mM (超純水)

調整後分光計にてスペクトルを測定し、 $\epsilon_{400} = 12,960$ を用いて濃度を算出する。

【10 mM Nitrobenzen solution】

Nitrobenzen 10 mM (超純水)

【10 mM Nitrophenol solution】

Nitrophenol 10 mM (超純水)

【10 mM Nitrosobenzene solution】

Nitrosobenzene 10 mM (超純水)

2. 活性測定

2-1. FAD, FMN, Riboflavin 還元活性測定

嫌気キュベットを用いて pH 7.0 50 mM Na-pi buffer (20 min 以上 Ar 吹き込み済み) と NADH フラビン (FAD or FMN or Riboflavin) を終濃度で $100 \mu\text{M}$ となるように加え、オレンジブチル栓を閉めて 15 min Ar.ガスを吹き込んだ。25 °C インキュベート 10 min 後、分光計 (HITACHI U-3310) にてフラビンの吸光係数 (FAD:450 nm, FMN:445 nm, Riboflavin:445) にて活性を測定した。活性値は 1 mg のタンパク質あたり、1 分間に減少するフラビン量で算出した。活性は 3 回測定した。

2-2. DCIP 還元活性測定

嫌気条件下で **2-1.** 同様に活性を測定する。DCIP の吸光係数 (600 nm) を検出し活性値を算出した。

2-3. Menadione 還元活性測定

嫌気条件下で **2-1.** 同様に活性を測定する。NADH の吸光係数 (340 nm) を検出し活性値を算出した。

2-4. 窒素化合物還元活性測定

嫌気条件下で **2-1.** 同様に活性を測定する。Nitrofrazon は吸光係数 (400 nm) を検出し、Nitrobenzen, Nitrophenol, Nitrosobenzene は NADH の吸光係数 (340 nm) を検出し、活性値を算出した。

3. 結果

各基質に対する活性値を Table 3-3-1 に示す。FAD, FMN, Riboflavin, DCIP, Menadione, Nitrofrazone に対して活性を検出した。特に DCIP, Menadione に対する活性は FAD と比べて 10 倍以上高かった。Nitrobenzene, Nitrophenol, Nitrosobenzene に対する活性値は検出できなかった。10 μ M FAD 存在下で酸素に対する活性値が上昇した。

Table 3-3-1. Substrate specificity of NPO.

	FAD	FMN	DCIP	Menadio ne	Nitrofra zon	O ₂	O ₂ (+FAD)	Nitroben zene	Nitroph enol	Nitrosobe nzene
NAD	3.25	2.39	68.95	652.01	0.27	0.18 (±	0.91 (±			
H	(±0.12)	(±0.13)	(±1.76)	(±8.36)	(±0.03)	0.01)	0.00)	ND	ND	ND
NAD	2.85	1.43	0.90	32.66	0.20	0.18 (±	1.07 (±			
PH	(±0.08)	(±0.79)	(±0.17)	(±3.30)	(±0.03)	0.00)	0.00)	ND	ND	ND
ND: not detected								U / mg protein (±SD)		

第三項 Oxidase 活性生成物の同定

1. 試薬の調製

NADH, FAD の調製方法は、同章 第一節 第二項 1 を参照する。

2. 活性測定

10 μ M FAD 存在下での NADH oxidase 活性を酸素電極により測定した。NADH は終濃度 50 μ M となるように調製し、酸素の減少がプラトーになった時点で catalase を添加した。

3. 結果

catalase 添加により減少量に対して半分量の酸素の発生が観察できたことから (Figure 3-3-3)、NPO による FAD 存在下での NADH oxidase 活性反応産物は過酸化水素であることが推定される。

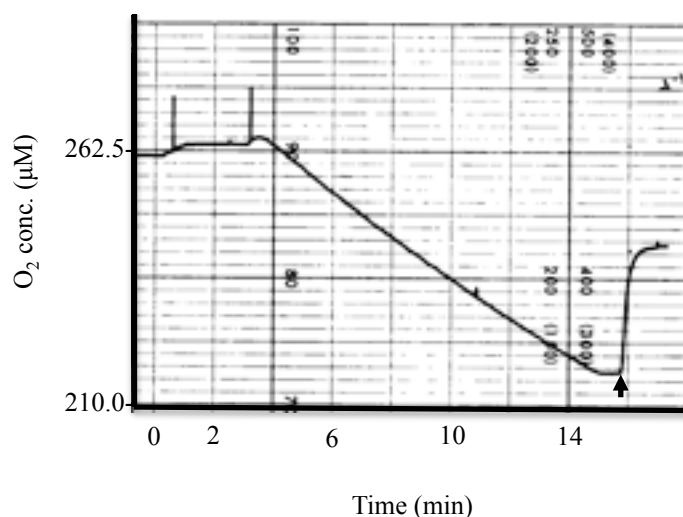


Figure 3-3-3. The product of NADH oxidase with FAD by NPO was H₂O₂. Catalase was added to reaction solution at point showed by arrow.

第四項 モル分子吸光係数の算出

1. 結合フラビンの分析

タンパク質濃度を Bradford 法により定量した NPO サンプルから第二章 第節 第項に準じてフラビンを調製し HPLC により結合フラビンを定量分析した。結合フラビンの濃度、タンパク質の濃度から、結合比を算出した。

2. モル分子吸光係数の算出

分光計 (HITACHI U-3310) を用いて Abs 441 が 0.5 以上となるように調製した NPO の 250-800 nm のスペクトルを測定した。サンプルのボリュームに対して 1/10 量の 10 % SDS solution を加え、よく攪拌し、同様にスペクトルを測定した。同様の操作をもう一度繰り返し、サンプル中 SDS 濃度を final 2 % として、スペクトルを測定した。サンプルを 100 °C 5 min ボイルし、同様にスペクトルを測定した (このときスペクトルピークが 445 nm となっていることを確認する)。各スペクトル分析時には 600, 700, 800 nm の吸光波長も測定し、Base line を補正する。以上の操作によりタンパク質結合 FMN をタンパク質より解離させる。スペクトル測定のまとめを Table 3-3-2 に示す。解離した時の FMN 濃度と、タンパク質と結合している時の吸光度の差からモル分子吸光係数を算出する (Table 3-3-3)。

Table 3-3-2. Aummary of actual values for each step of extinction coefficient calculation.

		No						
		additio	+1%	+1% SDS	+2 %	+2 % SDS	+2 % SDS	+2 % SDS 5min boil
		n	SDS	(vol. adjust.)	SDS	(vol. adjust.)	5min boil	(vol. adjust)
1s t	Abs 800 nm	0.001	0.002	0.002	0.000	0.000	0.002	0.002
	Abs 700nm	0.002	0.005	0.006	0.000	0.000	0.002	0.002
	Abs 600nm	0.003	0.003	0.003	0.000	0.000	0.002	0.002
	Base line							
	Ave.	0.002	0.003	0.004	0.000	0.000	0.002	0.002
	Top peak							
	WL (nm)	441	441	441	441	441	445	445
	Top peak							
	Abs.	0.609	0.548	0.603	0.497	0.596	0.452	0.542
	Base line							
2 n d	ajust	0.607	0.545	0.599	0.497	0.596	0.450	0.540
	Abs 800 nm	0.014	0.012	0.012	0.010	0.010	0.002	0.002
	Abs 700nm	0.018	0.015	0.015	0.014	0.014	0.002	0.002
	Abs 600nm	0.020	0.020	0.020	0.019	0.019	0.002	0.002
	Base line							
	Ave.	0.019	0.016	0.016	0.014	0.014	0.002	0.002
	Top peak							
	WL (nm)	441	441	441	441	441	445	445
	Top peak							
	Abs.	0.963	0.869	0.956	0.796	0.955	0.695	0.834
	Base line							
	ajust	0.944	0.853	0.940	0.782	0.941	0.693	0.832

Table 3-3-3. Calculation of extinction coefficient of NPO

	Abs at top peak		Extinction coefficient
	No treatment	After treatment	
1st	0.607	0.540	13714
2nd	0.944	0.832	13842
Ave.	-	-	13778

3. 結果

結合フラビンの定量分析により NPO と結合しているフラビンは FMN であることが明らかとなった (data not shown)。定量分析に供したフラビン濃度と、タンパク濃度から、rNPO は FMN と 1 : 1 で結合していることが明らかとなった。モル分子吸光係数の算出より、NPO のモル分子吸光係数は 13,778 と算出された。

第五項 分子量の解析

本項は蛋白質科学会アーカイブ#15 のプロトコルを参照している。

http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Measurement/blue_01/blue_01.pdf

1. 試薬の調製

以下の試薬を調製する。特に記載が無ければ Wako 純薬製のものを用いた。

【Cathode buffer】

Tricine (DOJINDO) /NaOH (pH 7.0)	50mM
Bis-Tris (DOJINDO) /HCl (pH7.0)	15 mM
CBB G-250 (BioRAD)	0.02 %

CBB G-250 添加、非添加で作製し、それぞれ 300 ml 程調製すれば十分。

【Anode buffer】

Bis-Tris/HCl (pH7.0)	50 mM
----------------------	-------

300 ml ほど作製すれば十分。

【Sample buffer】

CBB G-250	5%(w/v)
6-aminocaproic acid	500 mM
Bis-Tris/HCl (pH7.0)	100 mM
PMSF	1mM
Glycerol	20 %

1 ml 作製すれば十分。

2. Blue Native PAGE による分子量測定

Sample に対して 1 / 10 量の sample buffer を加え、氷上で 5 min 静置した。Sample を 5 -20 % グラジエントゲル (e-PAGEL ATTO 社) にアプライし、100 V の定電圧で 2 h 泳動した。Marker は HMW Native marker Kit (GE ヘルスケア社) のものを用いた。第三節 Cathode buffer を CBB の含まないものに交換し再び 100 V, 2 h 泳動した。泳動後 CBB R-250 で染色

した。

3. 結果

BN-PAGE により NPO の明瞭なバンドを観察した (Figure 3-3-4A)。Marker のバンドを参照に、ゲル上部からの泳動距離とタンパク質分子量を用いて検量線を作製した (Figure 3-3-4B)。下限の検量範囲外ではあったが、算出した近似式に NPO バンド距離を当てはめ、分子量を約 20 kDa と算出された。

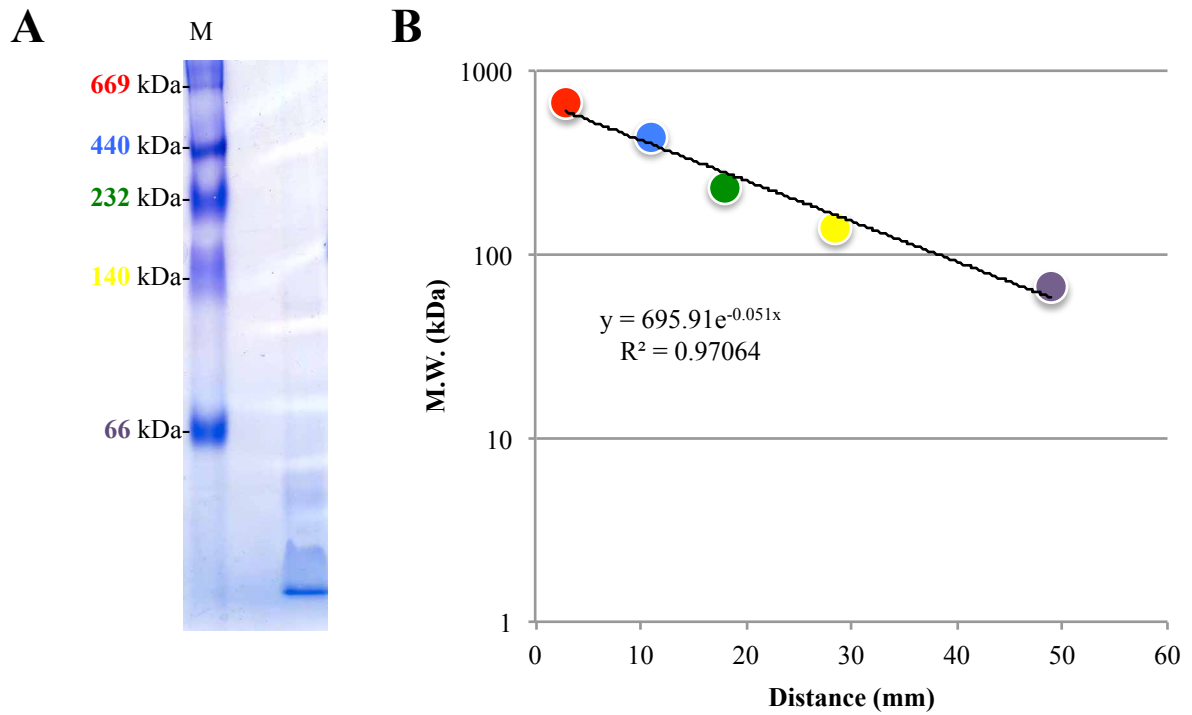


Figure 3-3-4. BN-PAGE and molecular calibration of NPO.

第六項 基質に対する K_m k_{cat} の算出

1. 試薬の調製

NADH, NADPH, FAD, FMN の調製は同章 第一節 第三項と第三節第二項に準ずる。

2. 活性測定

2-1. NADH

NADH を 5, 10, 20, 50, 100 μ M 条件下での、25 $^{\circ}$ Cにおける NADH oxidase 活性を測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 340 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は3回繰り返した。

2-2. NADPH

NADPH を 5, 10, 20, 50, 100 μ M 条件下での、25 $^{\circ}$ Cにおける NADPH oxidase 活性を測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 340 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は3回繰り返した。

2-3. FAD

FAD を 10, 20, 40, 80, 160 μ M 条件下での、25 $^{\circ}$ Cにおける FAD reductase 活性を測定した。活性は嫌気キュベットを用いて嫌気下で測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 450 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は3回繰り返した。

2-4. FMN

FMN を 10, 20, 40, 80, 160 μ M 条件下での、25 $^{\circ}$ Cにおける FMN reductase 活性を測定した。活性は嫌気キュベットを用いて嫌気下で測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 445 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は3回繰り返した。

2-5. Oxygen

酸素ポンペを用いて 3, 5, 10, 21, 50 %酸素濃度に液相置換した嫌気

キュベットで、25 °Cにおける NADH oxidase 活性を測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 340 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は 3 回繰り返した。

2-6. Oxygen ($8\ \mu\text{M}$ FAD 存在下)

酸素ポンプを用いて 3, 5, 10, 21, 50 %酸素濃度に液相置換した嫌気キュベットで、25 °Cにおける $8\ \mu\text{M}$ FAD 存在下での NADH oxidase 活性を測定した。分光計 (HITACHI U3310) を用いて 340 nm の減少を測定し、1 秒あたりの酵素 1 分子の活性中心あたりの回転率を活性値 (Tn)とした。測定は 3 回繰り返した。

3. データ解析

活性測定データは Sigma Plot 12 (HULINKS 社) を用いて解析した。 k_m , k_{cat} の算出には Michaelis-Menten kinetics を採用した。

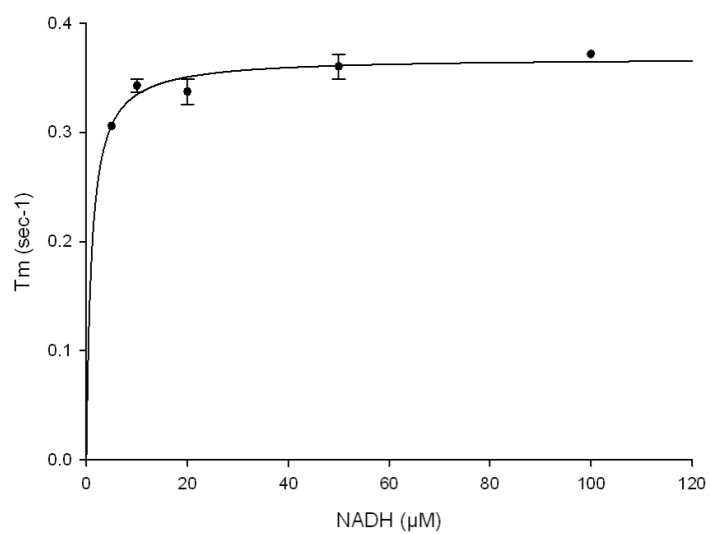
4. 結果

各基質への K_m , k_{cat} のまとめを Table 3-3-4 に示す。各基質に対する Michaelis-Menten kinetics を Figure 3-3-5,6,7,8,9,10 に示す。

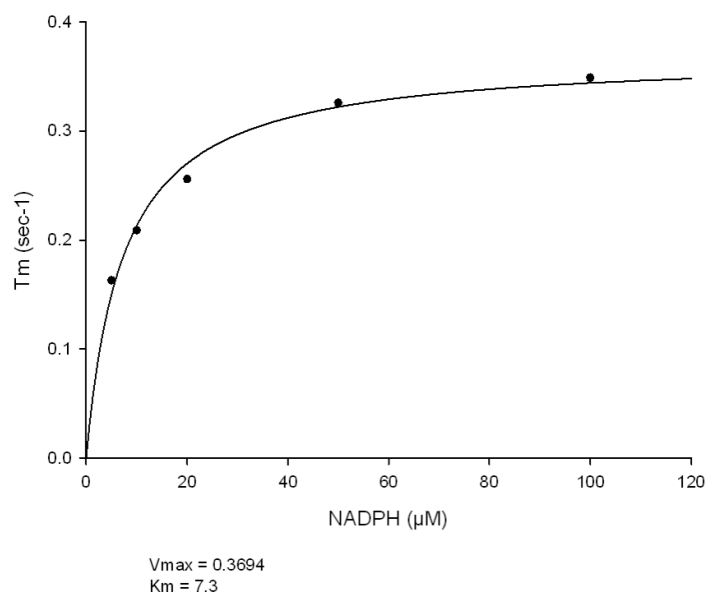
Table 3-3-4. Summary of K_m and k_{cat} to each substrats.

	Substrate					
	NADH	NADPH	FAD	FMN	Oxygen	Oxygen (with 8 μ M FAD)
k_m (μ M)	0.990	6.010	485.6	811.7	1300	12.30
k_{cat} (sec ⁻¹)	0.40	0.38	9.67	2.00	3.90	0.36

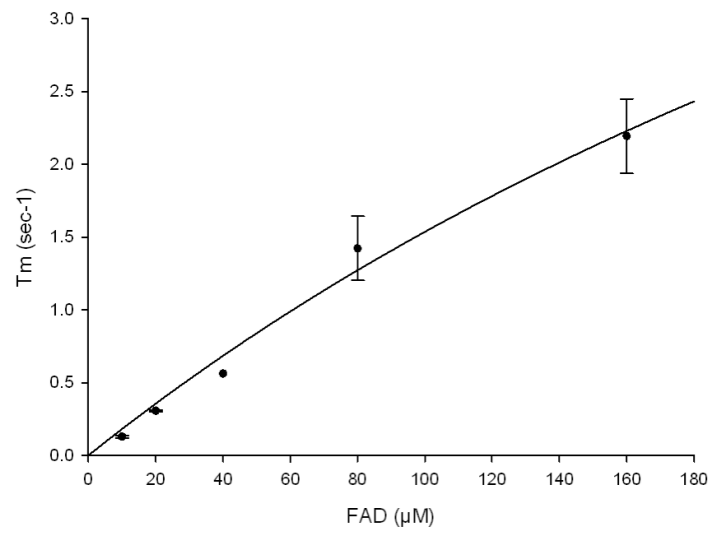
Michaelis-Menten



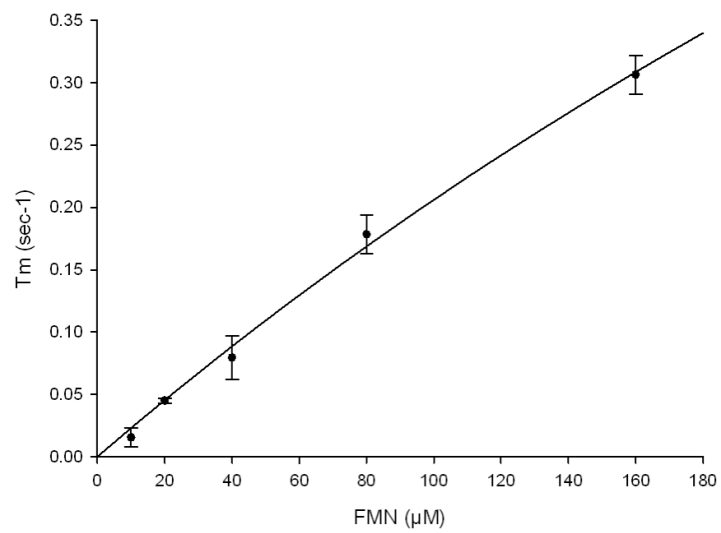
Michaelis-Menten



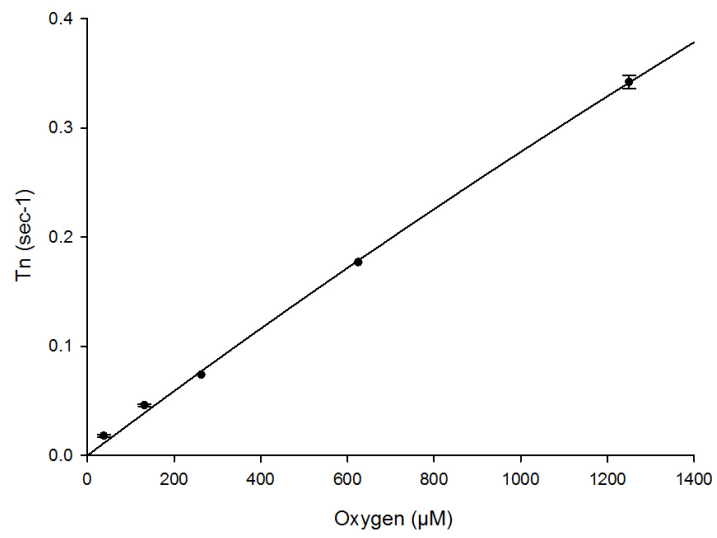
Michaelis-Menten



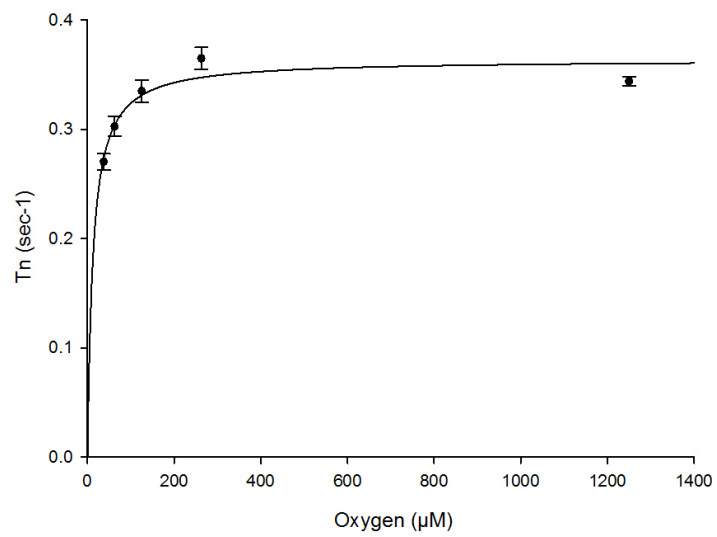
Michaelis-Menten



Michaelis-Menten



Michaelis-Menten



第四節 NPO 発現解析

第一項 培養、集菌

1. GY 培地の調製

第一章 第二節 第一項 に準じて培地を作製する。

2. 培養、集菌

第一章 第二節 第一項 に準じて、好気嫌気条件で定常培養と、途中酸素点添加培養を行った。

第二項 ノーザン解析

ノーザン解析の手法は第一章 第二節 第二項に準じて行い、NPO のプローブは同章 第二節 第一項で作製した NPO 遺伝子全長配列を用いた。

1. 結果

NPO ノーザン解析の結果と併せて、*nox1*, *prx* のノーザン解析の結果を Figure 3-4-1 に示す。*npo*, *nox1*, *prx* はすべて好気条件下で転写誘導が観察された。また、*nox1*, *prx* が酸素添加 10 min で転写誘導されるのに対して、*npo* は 30 min で転写誘導された。

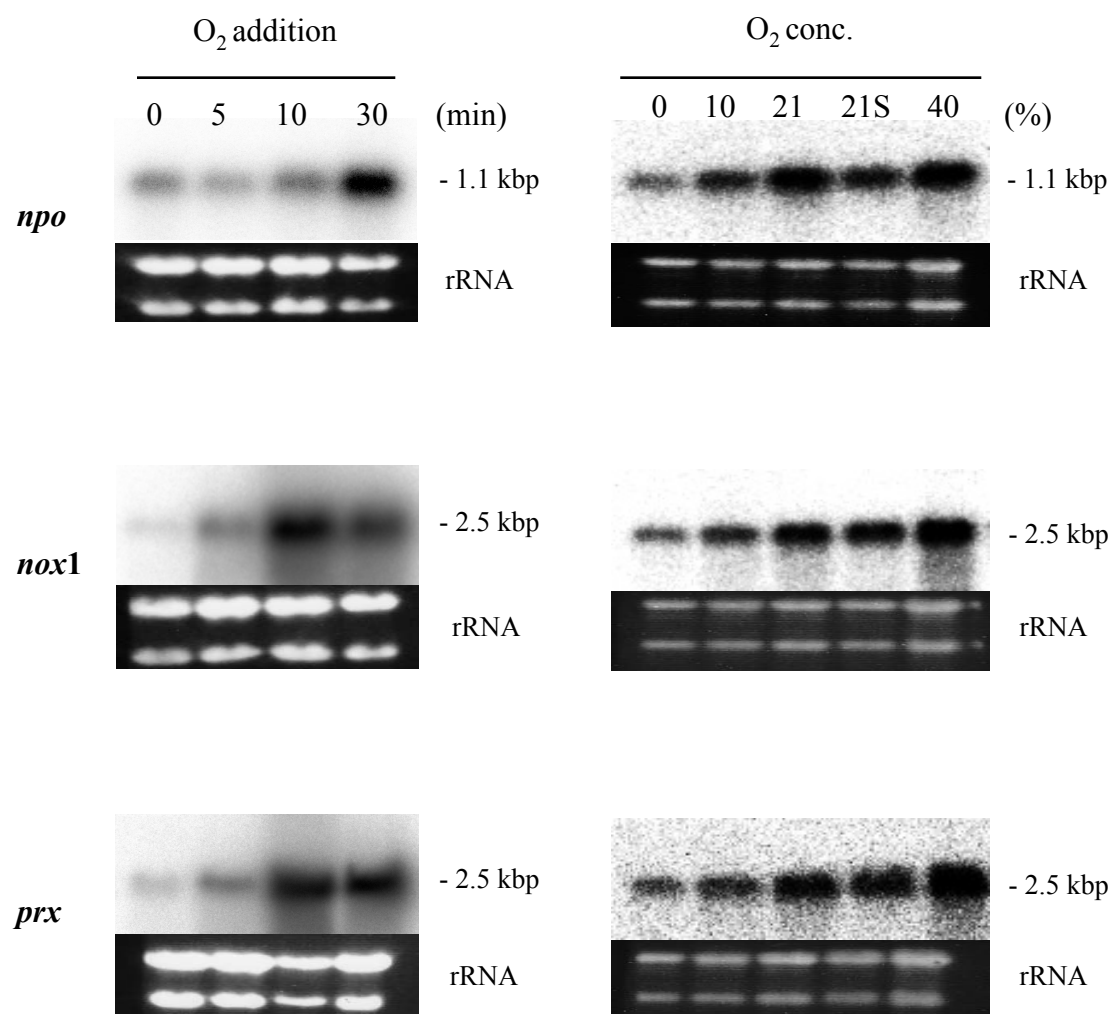


Figure 3-4-1. Northern analysis of *npo*, *nox1* and *prx* under various oxygen stress conditions.

第三項 ウェスタン解析

1. タンパク質抽出

好気、嫌気、途中酸素添加培養菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離により得られる無細胞抽出液をサンプルとした。無細胞抽出液のタンパク質濃度を Bradford 法により測定する。

2. ブロッキング

2 μ g/wel となるように SDS PAGE に供し、泳動後 PVDF 膜にブロッキングした。ブロッキング手法は前任者の論文を参照した[4]。

3. 抗原抗体反応

手法の詳細は前任者の論文を参照する[4]。一次抗体は 1 / 2,000 となるように添加した。

4. 染色

Lumi-Light Blotting Substrate (ROCHE 社) を用いて化学蛍光によるバンドの検出を試みた。蛍光検出は Bio chem (BIO RAD 社) を用いて、経時的に検出し、最もバンドが明瞭な時間のバンドを選択した。

5. 結果

ウェスタンブロッキング結果を Figure 3-4-2 に示す。

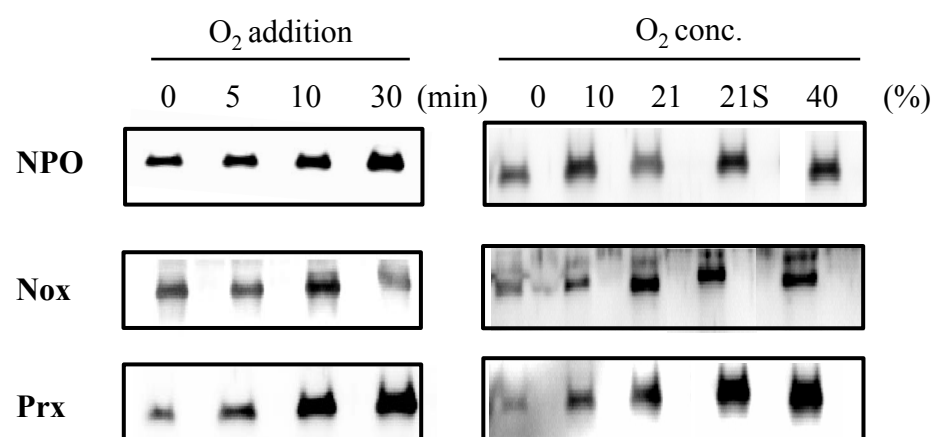


Figure 3-4-2.

第五節 小括

本章では、生理的な遊離フラビン FAD $8\mu\text{M}$ 条件下で、酸素代謝活性を有する酵素の探索を試み、Nox 以外に NPO を精製した。NPO は BLAST 解析の結果、*Bacillus cereus* G9241 の nitro reductase family protein と 66 %の相同性を有していた。しかし、BLAST 解析でヒットしたタンパク質中に機能が明らかなものは無く、機能未知酵素と推定した。基質特異性の検討の結果、FAD, FMN, riboflavin, nitrofrazon, menadione, DCIP に対して活性を有していた。Nitrofrazon は nitro reductase の代表的な基質であるにもかかわらず、活性は低かった。バクテリアにおいて、知見のある nitro reductase は大腸菌の NfsA, NfsB が知られている[25]ことから、活性を比較した。比較のまとめを Table 3-5-1 に示す。活性の傾向は、これらタンパクとは異なっていたことに加え、*A. xylanus* は呼吸鎖を欠如していることから、キノン (menadione) への反応性が高くとも、呼吸鎖への関与はない。

Table 3-5-1. Substrate specificity of NPO compared to NfsAB
from *Escherichia coli*.

e ⁻ donor	e ⁻ acceptor	Enzyme		
		NPO	NfsA	NfsB
NADH	Flavins			
	FAD	3.25 (±0.12)	3	1
	FMN	2.39 (±0.13)	1	1
	Miscellaneous			
	DCIP	68.95 (±1.76)	27	2
	Quinones			
	Menadione	652.01 (±8.36)	24	60
	Nitrocompounds			
	Nitrofrazon	0.27 (±0.03)	73	13
	Nitrobenzene	ND	52	94
	Nitrophenol	ND	0.5	0.1
	Nitrosobenzene	ND	-	-
	Oxygen			
	O ₂	0.18 (± 0.01)	-	-
	O ₂ (+FAD)	0.91 (± 0.00)	-	-

また、NPO の転写発現解析を試みたところ、定常的に培養した菌体をサンプル

とした場合に、本酵素は酸素存在下で転写、発現が誘導されることを見いだした。これは Nox, Prx と共通している (Figure 3-4-1, 3-4-2)。酸素添加後の経時的なサンプリングからの転写は 10 min で最も転写が誘導される Nox, Prx とは異なり、30 min で最も転写誘導された。ここから、Nox とは異なる酸素代謝応答を推察している。酸素ストレスへの応答が Nox, Prx と比較して遅れることから、酸素代謝に於ける Nox の補助的な機能を考察している。酸素ストレスにより生じる二次的な応答経の関与も否定できない。

以上の解析より、本酵素は *A. xylanus* において遊離フラビンが関与する酸素代謝活性に関与することが示唆された。

触媒効率の観点から Nox と比較すると、NPO は遊離フラビン存在下での酸素代謝活性が Nox の 1 / 15 であることが見いだされた (Figure 3-4-3)。加えて、精製 1 st column での活性ピーク分画後の活性値の比較より、Nox を含む画分の方が NPO を含む画分よりも相対活性が高かった。以上より、Nox は *A. xylanus* において主要な酸素代謝酵素であると推定した。

序論

NADH oxidase (Nox) -Prx 系は *A. xylanus* 細胞内で、酸素代謝、過酸化水素分解、酸化還元バランスを担う要酵素系として推定されている[26]。NADH oxidase-Prx 系の過酸化水素分解反応は初反応である NADH の酸化 (Nox 中の補因子である FAD の還元) 反応が約 200 sec^{-1} で進行するのに対し、二タンパク質間の四官能基が関与した反応にもかかわらず、過酸化水素分解反応が $150 \sim 180 \text{ sec}^{-1}$ で進行する (Figure 4-0-1) という、酵素反応の限界に近い高速で進行する。本反応は各々のタンパク質間のジスルフィド結合を介した電子伝達により進行する。高速な反応を可能にする為にはこれらの活性中心の近接が重要であり、活性中心の近接には二タンパク質間の複合体の形成が鍵であると考察し、NADH oxidase- Prx の複合体解析と結晶構造解析がなされてきた[4, 27, 28]。これまでに行われた複合体解析の結果を Table 4-0-1 に示す。これまでの解析の結果、Nox, Prx は複合体を形成すること、複合体形成にはモル濃度比と塩強度が重要であることが示唆されている。しかしながらこれまでの解析では明確な分子量と Nox, Nox-Prx 複合体構造を決定できてはいない。そこで本章では、新たに Blue NativePAGE, 静的光散乱法、沈降平衡法を用いた分子量解析と SAXS を用いた構造的なアプローチからの解析も併せて、NADH oxidase- Prx 複合体の高速反応性について考察する。

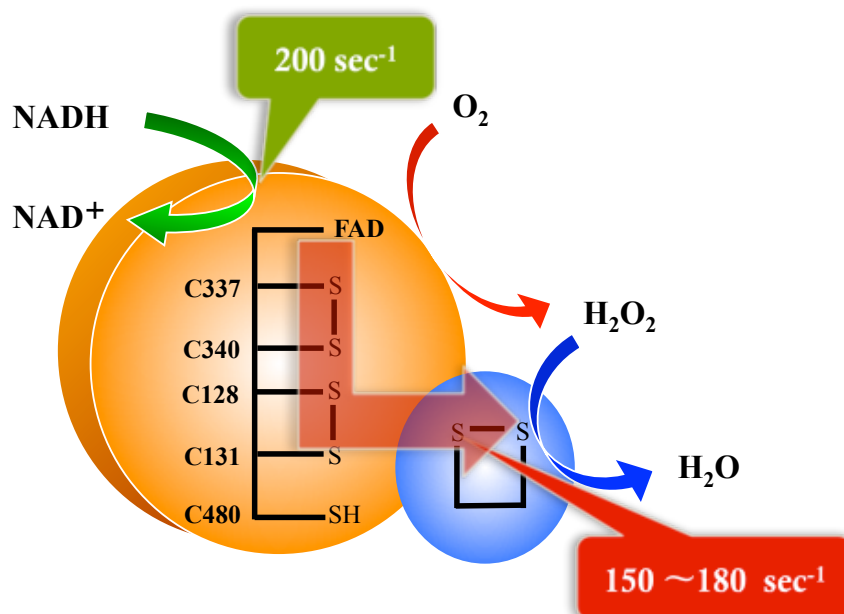



Figure 4-0-1. Reaction mechanism scheme of Nox-Prx complex.

Table 4-0-1. Summary of previous analysis about Nox-Prx complex

	Nox : 2mer (kDa)	Prx : 10 mer (Kda)	Complex (kDa)	K_D
Theoretical value	109.954	207.74	?	?
MW analysis				
				24 ± 7
Surface Plasmon Resonance	-	-	-	
Dynamic Light Scattering	$\doteq 100$	$\doteq 200$	$\doteq 300$	
Analytical ultracentrifuge				
Sedimentation Velocity	-	153.272	-	-
Sedimentation Equilibrium	95.626	164.472	-	-
Structure analysis				
Crystal structure	?		?	

第一節 NADH oxidase の精製

第一項 培養、集菌、発現確認

1. LB 培地 (Amp⁺) の作製

第三章 第二節 第一項に準じて LB 培地 (Amp⁺) を作製する。

2. 培養、集菌、発現確認

A. xylanus 由来 NADH oxidase 遺伝子形質転換株 (*Escherichia coli* JM109) を 3 ml LB 培地 (Amp⁺) に 1 白金ドリル分植菌し、30 °C で 14 時間、170 rpm 振とう培養して菌起こしをした。菌起こし菌体を 3 ml LB 培地 (Amp⁺) に一白金耳分植菌し、37 °C で 1.5 時間、170 rpm 振とう培養した。100 ml LB 培地 (Amp⁺) 1.5 L LB 培地 (Amp⁺) スケールアップし、O.D.₆₆₀=0.3 ~0.5 で 100 mM IPTG を 200 ml 添加 (final 1 mM) し、37 °C で 5 時間培養し NADH oxidase、IPTG 添加前後で 1ml 集菌し、IPTG 誘発を行った。集菌は、氷嚢で素早く冷却し BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JLA 10.500) で 6,000 rpm、5 min、4 °C にて行い、pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1mM EDTA) で 3 回洗浄した後、菌体重量の 2 倍量の同 buffer で懸濁し、液体 N₂ にて凍結後使用するまで -80 °C にて保存した。IPTG 発現確認により、目的の分子量のバンドが発現されていることを確認した (Data not shown)。

第二項 精製

1. 菌体破碎、粗酵素液の調製

-80 °C の保存菌体 60 g を湯浴で解凍し、菌体が全て解凍される直前に、菌体重量の 2 培養の pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1 mM EDTA 含有) を加えた。終濃度 10 mM, 1 mg / 菌体 1g になるように 500 mM EDTA と lysozyme をそれぞれ添加し、DNase を適当量添加後、氷中下でスターラーにより 30 分間攪拌した。French Press 30,000 psi (AMINCO 社製) にて 140 Mpa で 3 回菌体破碎を行った。1 回目の破碎後に終濃度 2 mM の PMSF の半分量を添加し氷中にて 10 分攪拌後、2 回目の破碎後に全ての PMSF を添加し同様の操作後に 3 回目の破碎を行った。BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JLA 10.500) を用いて、16,800×g で 30 分間 4 °C で遠心分離した。上澄みを回収し、再び BECKMAN 遠心機 (Rotor ID: 45 Ti)

を用いて、100,000×g で 2 時間 4 °C で遠心分離し、可溶性画分の無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液の全量に対して 1/3 量の pH 8.0, 50mM Tris-HCl で調製した 10 % (w/v) ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako, 生化学用) を添加し、0.1N NaOH で pH 7.0 に調整後、氷中で 30 分間攪拌した。その後、BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JLA 10.500) を用いて 16,800×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、脱核酸処理を行った。上澄みをメスシリンダーで計量し、硫酸アンモニウム (Wako) を 143 g/L になるように添加し、2.8% のアンモニア水で pH 7.0 に調整後、氷中にて 30 分間攪拌した。BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JA 25.50) を用いて 69,700×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、硫酸アンモニウム沈殿を行った。遠心上清を回収し、粗酵素液を得た。

2. 1 st column Butyl TOYOPEARL 650S

得られた粗酵素液を pH 7.0, 50mM Na-pi buffer (1mM EDTA, 25 μM FAD, 143 g/L 硫酸アンモニウム含有) で平衡化した Butyl-TOYOPEARL 650s (φ32×520 mm, column volume 418 ml, 東ソー社製) に供し、同 buffer で洗浄後、143 - 0 g/L 硫酸アンモニウム含有の同 buffer (1,000ml×2) で linear gradient elution を行い Foxy 200™ X-Y Fraction collector により溶出画分をワッセルマンに回収した。溶出画分を SDS-PAGE に供し NADH oxidase 画分を選定した。分画した活性画分を回収し、5L の pH 6.5, 50mM Na-pi buffer (1mM EDTA, 25 μM FAD) で 4 °C のもと 4 時間の透析処理を 3 回行った。透析膜は 10,000 cut off の三光純薬株式会社製を用い、透析中は 30 分毎に上下に攪拌した。

3. 2nd column DEAE sepharose Fast Flow

脱塩透析処理した粗酵素液を回収し、BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JA 25.50) を用いて 69,700×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、上澄みを pH 6.5, 50mM Na-pi (1 mM EDTA, 25 μM FAD) buffer で平衡化済みの DEAE-sepharose Fast Flow column (φ26×640 mm, column volume 340 ml, GE healthcare 社製) に供した。同 buffer で洗浄後、pH 6.5, 50mM Na-pi (140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 25 μM FAD) buffer で洗浄し、140 mM - 250 mM NaCl 含有の同バッファー (1,000 ml×2) の linear gradient elution により目的タンパク質を溶出させ、Foxy 200™ X-Y Fraction collector により回収した。溶出画分を SDS-PAGE に供し NADH oxidase 画分を選定した。

4. 3rd column HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade

pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1 mM EDTA 含有) で平衡化済みの HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade に供し、流速 1 ml / min 以下の条件にて溶出画分をワッセルマンに回収し、SDS-PAGE に供して精製純度の確認を行った。純度の高い画分を回収し、Amicon Ultra 30k (MILLIPORE 社) を使用して濃縮を行い、pH 7.0 50 mM Na-pi buffer への buffer 置換を行った。以上の操作により、高純度な NADH oxidase 単タンパク質標本を取得した (Figure 4-1-1)。

第二節 Prx の精製

第一項 培養、集菌、発現確認

1. LB 培地 (Amp⁺) の作製

第三章 第二節 第一項に準じて LB 培地 (Amp⁺) を作製する。

2. 培養、集菌、発現確認

A. xylanus 由来 Prx 遺伝子形質転換株 (*Escherichia coli* JM109) を 3 ml LB 培地 (Amp⁺) に 1 白金ドリル分植菌し、30 °C で 14 時間、170 rpm 振とう培養しで菌起こしをした。菌起こし菌体を 3 ml LB 培地 (Amp⁺) に一白金耳分植菌し、37 °C で 1.5 時間、170 rpm 振とう培養した。100 ml LB 培地 (Amp⁺) 1.5 L LB 培地 (Amp⁺) スケールアップし、O.D.₆₆₀=0.3~0.5 で 100 mM IPTG を 200 ml 添加 (final 1 mM) し、37 °C で 5 時間培養し NADH oxidase、IPTG 添加

前後で 1ml 集菌し、IPTG 誘発を行った。集菌は、氷嚢で素早く冷却し BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JLA 10.500) で 6,000 rpm、5 min、4 °C にて行い、pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1mM EDTA) で 3 回洗淨した後、菌体重量の 2 倍量の同 buffer で懸濁し、液体 N₂ にて凍結後使用するまで -80 °C にて保存した。IPTG 発現確認により、目的の分子量のバンドが発現されていることを確認した (Data not shown)。

第二項 精製

1. 菌体破碎、粗酵素液の調製

−80 °C の保存菌体 60 g を湯浴で解凍し、菌体が全て解凍される直前に、菌体重量の 2 培養の pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1 mM EDTA 含有) を加えた。終濃度 10 mM, 1 mg / 菌体 1g になるように 500 mM EDTA と lysozyme をそれぞれ添加し、DNase を適当量添加後、氷中下でスターラーにより 30 分間攪拌した。French Press 30,000 psi (AMINCO 社製) にて 140 Mpa で 3 回菌体破碎を行った。1 回目の破碎後に終濃度 2 mM の PMSF の半分量を添加し氷中にて 10 分攪拌後、2 回目の破碎後に全ての PMSF を添加し同様の操作後に 3 回目の破碎を行った。BECKMAN 遠心機 (AvantiTM HP-25, Roter ID:JLA 10.500)を用いて、16,800×g で 30 分間 4 °C で遠心分離した。上澄みを回収し、再び BECKMAN 遠心機(Rotor ID: 45 Ti)を用いて、100,000×g で 2 時間 4 °C で遠心分離し、可溶性画分の無細胞抽出液を調製した。得られた無細胞抽出液の全量に対して 1/3 量の pH 8.0, 50mM Tris-Hcl で調製した 10 % (w/v) ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako, 生化学用) を添加し、0.1N NaOH で pH 7.0 に調整後、氷中で 30 分間攪拌した。その後、BECKMAN 遠心機 (AvantiTM HP-25, Roter ID:JLA 10.500)を用いて 16,800×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、脱核酸処理を行った。上澄みをメスシリンダーで計量し、硫酸アンモニウム(Wako) を 143 g/L になるように添加し、2.8% のアンモニア水で pH 7.0 に調整後、氷中にて 30 分間攪拌した。BECKMAN 遠心機 (AvantiTM HP-25, Roter ID:JA 25.50)を用いて 69,700×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、硫酸アンモニウム沈殿を行った。遠心上清を回収し、粗酵素液を得た。

2. 1 st column Butyl TOYOPEARL 650S

得られた粗酵素液を pH 7.0, 50mM Na-pi buffer (1mM EDTA, 25 μM FAD, 143 g/L 硫酸アンモニウム含有) で平衡化した Butyl-TOYOPEARL 650s (φ32×520 mm, column volume 418 ml, 東ソー社製) に供し、同 buffer で洗浄後、143 - 0 g/L 硫酸アンモニウム含有の同 buffer (1,000ml×2) で linear gradient elution を行い Foxy 200TM X-Y Fraction collector により溶出画分をワッセルマンに回収した。溶出画分を SDS-PAGE に供し NADH oxidase 画分を選定した。分画した活性画分を回収し、5L の pH 6.5, 50mM Na-pi buffer (1mM EDTA, 25 μM FAD) で 4 °C のもと 4 時間の透析処理を 3 回行った。透析膜は 10,000 cut off の三光純薬株式会社製を用い、透析中は 30 分毎に上下に攪拌した。

3. 2nd column DEAE sepharose Fast Flow

脱塩透析処理した粗酵素液を回収し、BECKMAN 遠心機 (Avanti™ HP-25, Roter ID:JA 25.50)を用いて 69,700×g, 0 °C で 30 分間の遠心処理を行い、上澄みを pH 7.0, 25 mM K-pi buffer (1mM EDTA)で平衡化済みの DEAE-sepharose Fast Flow column (φ26×640 mm, column volume 340 ml, GE helthcare 社製)に供した。同 buffer で洗浄後、pH 7.0, 250mM K-pi buffer で更に洗浄し、250 mM – 300 mM NaCl 含有の同バッファー(1,000 ml×2)の linear gradient elution により目的タンパク質を溶出させ、Foxy 200™ X-Y Fraction collector により回収した。溶出画分を SDS-PAGE に供し Prx 画分を選定した。

4. 3rd column HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade

pH 7.0, 50 mM Na-pi buffer (1 mM EDTA 含有) で平衡化済みの HiLoad 26 / 60 Superdex 200 prep grade に供し、流速 1 ml / min 以下の条件にて溶出画分をワッセルマンに回収し、SDS-PAGE に供して精製純度の確認を行った。得られた画分は、Apollo High-Performance Centrifugal Concentrators MWCO 9 kDa (Orbital Biosciences 社) を使用して濃縮した。以上の操作により、高純度な NADH oxidase 単一タンパク質標本を取得した (Figure 4-1-1)。

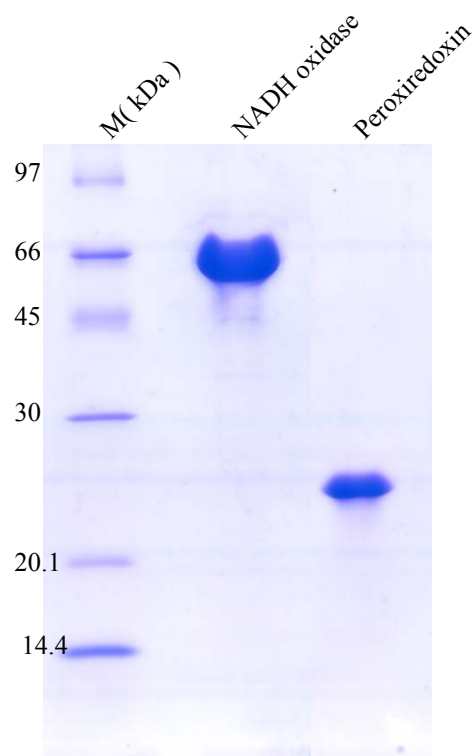


Figure 4-1-1. SDS PAGE of purified NADH oxidase and Peroxiredoxin by *E. coli* JM 109.

第三節 NADH oxidase- Prx 複合体分子量測定

第一項 Blue Native PAGE による解析

1. 試薬の調製

第三章 第三節 第五項に準じて試薬を調製する。

2. サンプルの調製

Nox, Prx, Nox/Prx を 13, 65, 13/64 μ M となるように硫酸アンモニウム濃度 0, 300, 600 mM 含有の pH 7.0 50 mM HEPES buffer に懸濁する (計 9 サンプル)。濃度調整には分光計を用いて、Nox: ϵ 450 nm = 13,500, Prx: ϵ 280 nm = 25,800 を基に算出した。調製サンプルの詳細を Table 4-3-1 に示す。

Table 4-3-1. Summary of the samples condition.

	AS conc. (mM) in pH 7.0 50 mM HEPES buffer		
	0	300	600
Nox (μ M)	13	13	13
Prx (μ M)	65	65	65
Nox/Prx (μ M)	13/65	13/65	13/65

3. 電気泳動

第三章 第三節 第五項に準じて泳動する。

4. ウェスタンブロッティング

泳動後のゲルを PVDF 膜 (Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting, Bio RAD 社) にブロッティングし、Nox, Prx 抗体を用いてウェスタンブロッティングに供した。ウェスタンブロッティング手法は第三章第四節 第三項を参照する。抗体はそれぞれ 1 / 1,000 量, 1 / 2,000 量で一次抗体反応を行った。

5. 結果

Nox はイオン強度によらず二量体を形成し、Prx は塩強度に応じて量体を形成した。Nox, Prx を混合した時にのみ現れるバンドを観察し、これが複合体のバンドであると示唆される (Figure 4-3-1A)。これを支持する

ように、複合体のバンドであると示唆されたバンドには Nox, Prx の両抗体と抗原抗体反応を示した (Figure 4-3-1BCD)。反応分子量マーカーの分子量と泳動距離から分子量を計算すると、約 311 kDa と算出された (Figure 4-3-2)。

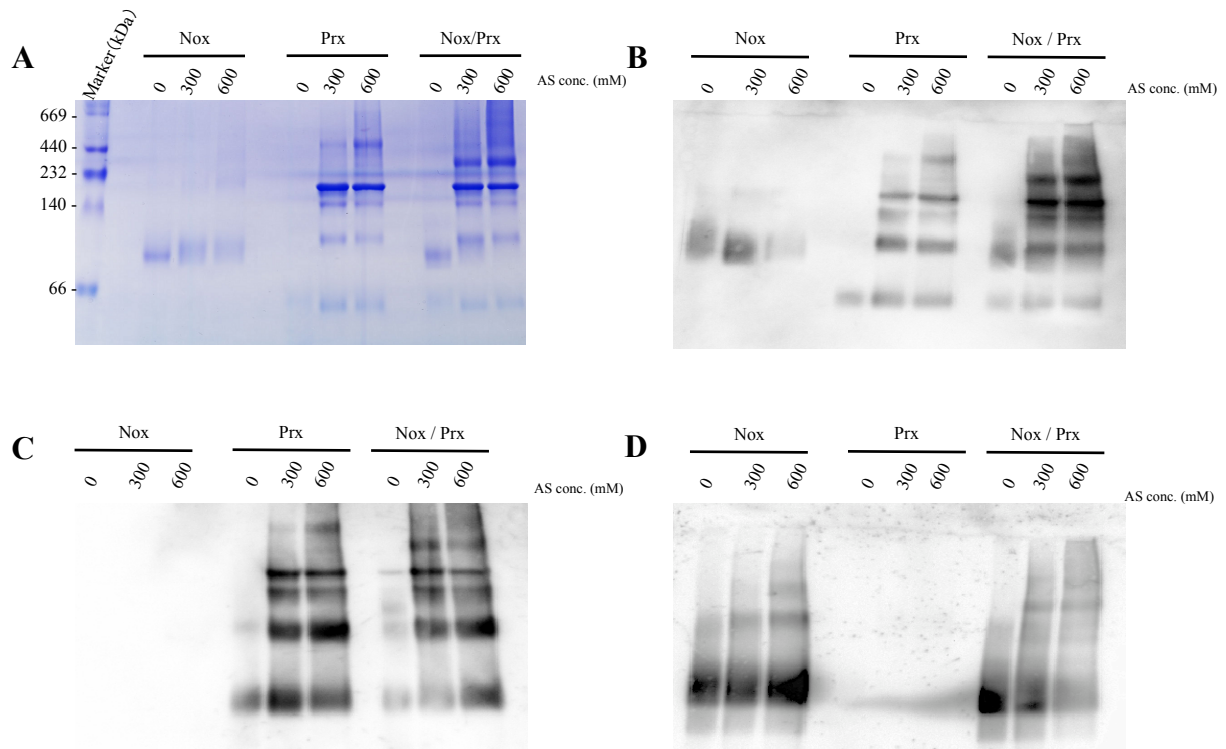


Figure 4-3-1. BN PAGE and western blotting of Nox, Prx and Nox/Prx complex.

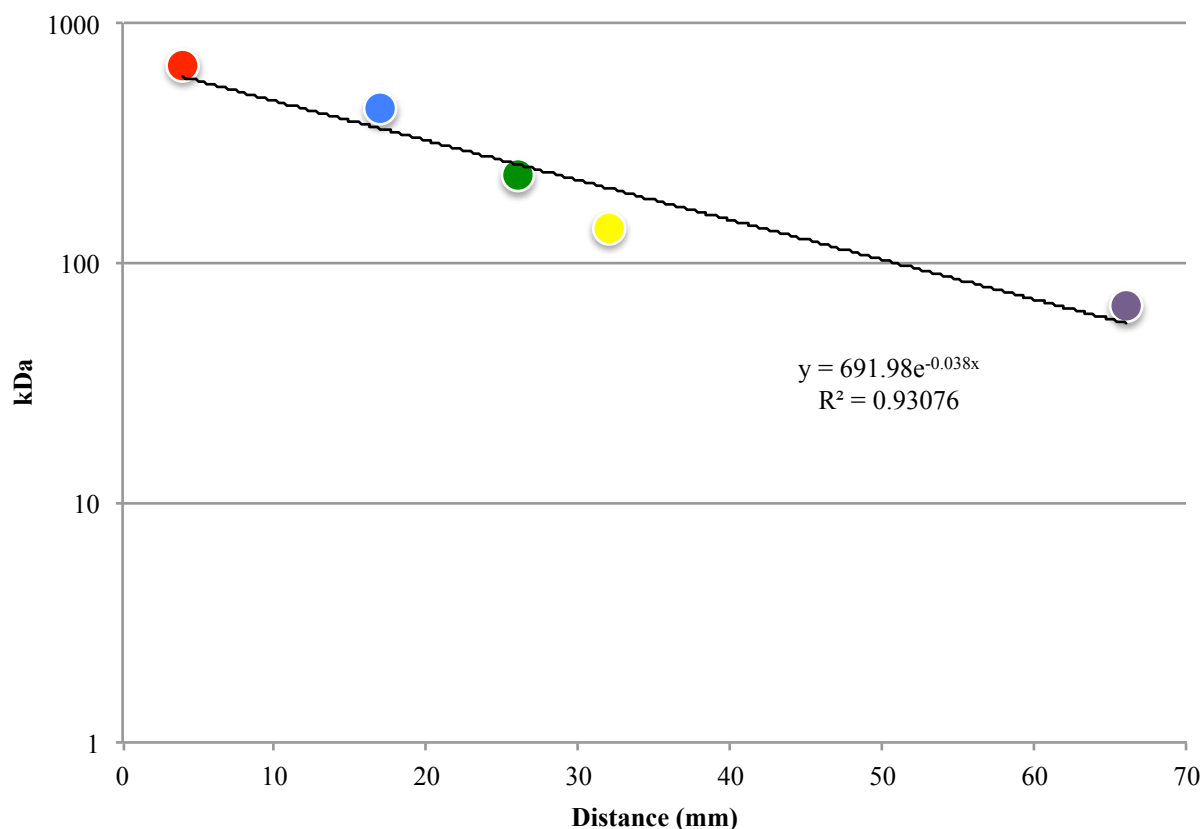


Figure 4-3-2. Calibration curve of MW marker by BN PAGE. Red: Thyroglobulin:660 kDa, Blue: Ferritin 440 kDa, Green: Catalase 232 kDa, Yellow: Lactate dehydrogenase 140 kDa, Purple: Albumin 66 kDa.

第二項 Static Light Scattering による解析

1. サンプルの調製

Nox, Prx を 300 mM AS 含有 pH 7.0 50 mM HEPES buffer で透析する。透析には透析カセット (Thermo scientific 社) を用いて透析した。透析後 Nox, Prx を $\bigcirc \bigcirc$ mg / ml に調整する。濃度調整には分光計を用いて、Nox: ϵ 450 nm = 13,500, Prx: ϵ 280 nm = 25,800 を基に算出した。濃度調整した Nox, Prx と透析外液 buffer を測定直前に 0.45 μ m のフィルターで濾過し、減圧遠心機を用いた脱気後に測定した。

2. 測定

濃度調整した Nox, Prx, 透析外液を Calypso (Wyatto Technology 社) にセットし、事前にセットしたプログラム (東工大 金丸准教授) に準じて測定した。

3. 結果

静的光散乱解析の結果、解析データのフィッティングには Nox) : Prx の結合比の設定が 1:1 (Figure 4-3-3) よりも 2:1 (Figure 4-3-4) の方がより低いカイ二乗定数 (Chisqr)を示し、良いフィッティングを示した。3:1 (Figure 4-3-5) に設定したときのフィッティングは 2:1 設定よりも悪くなった。各条件でのフィッティング結果のまとめを Table 4-3-2 に示す。これより、Nox : Prx の結合比は 2:1 であることが示唆される。このフィッティング条件時の Nox, Prx 分子量はそれぞれ 105.9 kDa, 201.7kDa で解離定数は 7.08×10^{-6} と算出された。これは Nox, Prx がそれぞれ 2 量体と 10 量体にオリゴマー形成し、複合体を緩く形成することを示している。

Table 4-3-2. Summary of SLS results.

	Nox (2mer) : Prx (10mer)		
	1 : 1	2 : 1	3 : 1
ChiS qr	1.23×10^{-1}	3.01×10^{-2}	4.09×10^{-2}
MW			
Nox (kDa)	106.5	105.9	105.8
Prx (kDa)	200.2	201.7	202.3
K_D	2.15×10^{-6}	7.08×10^{-6}	12.3×10^{-6}

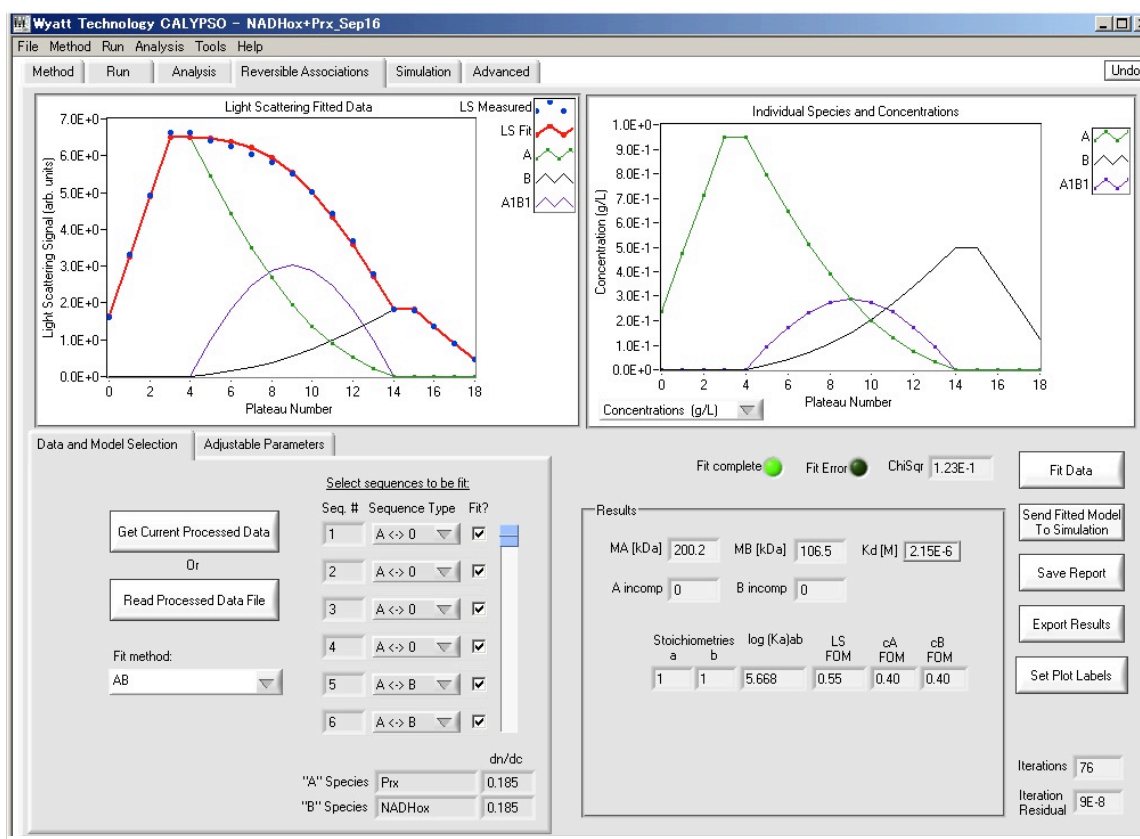


Figure 4-3-3. Nox(2mer) : Prx (10mer)を 1:1 の条件での Calypso 計算結果。

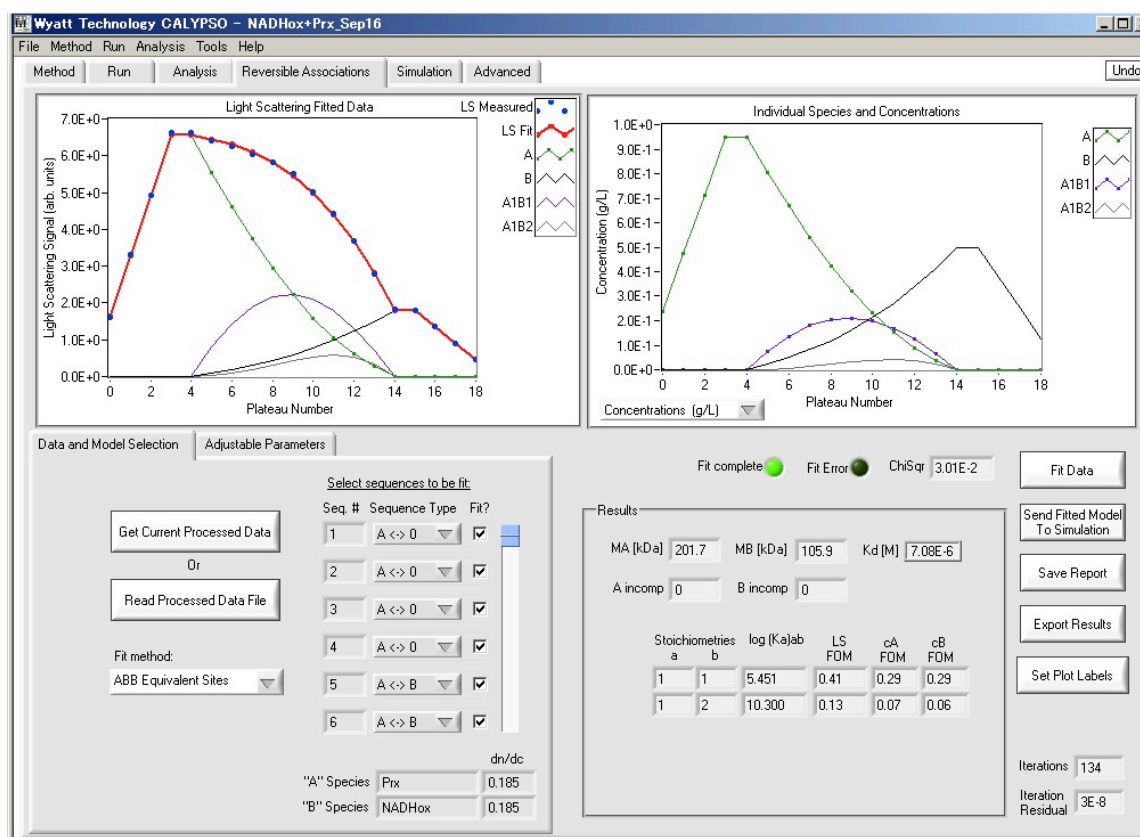


Figure 4-3-4. Nox(2mer) : Prx (10mer)を 2:1 の条件での Calypso 計算結果。

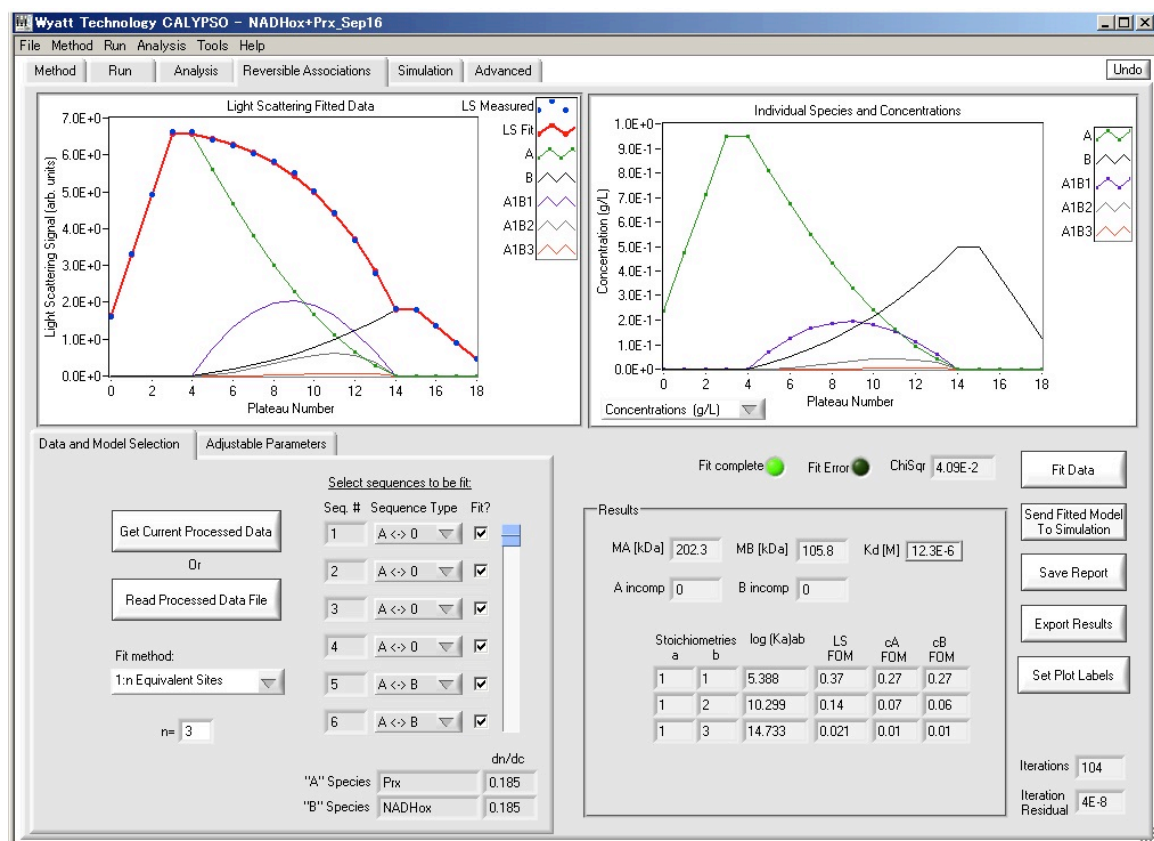


Figure 4-3-4. Nox(2mer) : Prx (10mer)を 3:1 の条件での Calypso 計算結果。

第三項 Short column Sedimentation equilibrium による解析

1. サンプルの調製

Nox, Prx 溶液を 300 mM 硫酸アンモニウム含有 pH 7.0 50 mM HEPES buffer で透析する。透析後に Nox, Prx を分子吸光係数 (ϵ 450, 280 = 13,600, 25,800) を用いて、それぞれ 0.25, 0.4 mg / ml となるように調製する。調製した Nox, Prx を Nox : Prx = 0 : 1, 0.9 : 0.1, 0.8 : 0.2, 0.7 : 0.3, 0.6 : 0.4, 0.5 : 0.5, 0.4 : 0.6, 0.3 : 0.7, 0.2 : 0.8, 0.1 : 0.9, 0 : 1 となるように混合し、各溶液は総量で 200 μ l 作製した。

2. 測定

ここからの実験は東京工業大学有坂研究室准教授 有坂文雄准教授に行って頂いた。調製したサンプルを遠心機 Optima XL-I (Beckman-Coulter, 8 hole An-50Ti rotor, Charcoal-Filled Epon double sector centerpiece and quartz windows) にセットし、7,100 rpm 20 h, 10,500 rpm 16 h, 13,000 rpm 16 h で遠心した。

3. 結果

測定データは Dr. Minton 氏 (NIH professor) に解析頂いた。以下に Minton 氏による解析結果を示す。

Allen Minton

Nov 27, 2013

I have modified the model for the dependence of signal-average buoyant mass upon composition to eliminate the arbitrary relation between “real” and buoyant masses of A and B. The annotated model is shown below.

```
-----  
function y = xf_bivalentAPlusB_bMw_fA_Nov27(mode,P,x)  
% x = fA (vol fraction of solution of conc wA)  
% y = signal-av bMW  
% P(1) = wA (constant) - w/v concentration of stock solution of A  
% P(2) = wB (constant) - w/v concentration of stock solution of B  
% P(3) = MA  
% P(4) = MB  
% P(5) = fAcomp - fraction of competent A  
% P(6) = fBcomp - fraction of competent B  
% P(7) = log K1
```

```

% P(8) = K2/K1;
% P(9) = alpha (cooperativity factor)
global npars parname
global cAcompt cBcompt K1 K2 alpha
if mode==0 %----- parameter names and setup calcs -----
    npars = 9;
    parname = {'wA(constant)','wB(constant)','MA','MB','fAcomp','fBcomp','log K1
(M^-1)','K2/K1','alpha'};
    y = zeros(size(x));
else
    % ----- function calcs -----
        % epsA = .209; % per micromolar Nox dimer
        % epsB = .260; % per micromolar Prx decamer;
    epsA = 1.9;
    epsB = 1.18;
    wAsoln = P(1);
    wBsoln = P(2);
    MA = P(3); % Nox dimer
    MB = P(4); % Prx decamer
    bMA = .245*MA;
    bMB = .245*MB;
    fAcomp = P(5);
    fBcomp = P(6);
    K1 = 10^P(7);
    K2 = P(8)*K1;
    % buoyant mass calc uses measured value of density
    % increment
    % same as above
    % mass fraction of A competent to bind
    % mass fraction of B competent to bind
    % association constant for binding to site 1
    % association constant for binding to site 2
    % per g/l Nox
    % per g/l Prx
    % w/v concentration of A (Nox) in solution A

```

```

% w/v concentration of B (Prx) in solution B
alpha = P(9); % cooperativity factor for interaction between 2
fA = x;
% binding sites
% the next two statements ensure that fA will remain
% within range of the numerical equation solver
inrange = (fA > 0) & (fA < 1);
fA = inrange.*fA + (fA <= 0).*1e-10 + (fA >= 1).*(1 - 1e-10);
wAtotal = fA*wAsoln;
wBtotal = (1-fA)*wBsoln;
% calculation of the concentrations of competent and incompetent A
and %B wAcomp = fAcomp*wAtotal; wBcomp = fBcomp*wBtotal;
wAincomp = wAtotal - wAcomp;
wBincomp = wBtotal - wBcomp;
cAincomp = wAincomp/MA;
cBincomp = wBincomp/MB;
cAcomp = wAcomp/MA;
cBcomp = wBcomp/MB;
cA = zeros(size(x));
% numerical solution of the conservation of mass equations for the
% concentration of free competent "monomer" of A
for i = 1:length(x)
    cAcomp = cAcomp(i);
    cBcomp = cBcomp(i);
    % call the MATLAB numeric equation solver to obtain the root of the
    % function 'solvecA' which satisfies conservation of mass equations
    cA(i) = fzero(@solvecA,[0 cAcomp]);
end
% calculation of the concentrations of remaining species
cB = cBcomp./(1 + (K1 + K2)*cA + alpha*K1*K2*cA.^2);
cAB1 = K1*cA.*cB;
cAB2 = K2*cA.*cB;
cA2B = alpha*K1*K2*cA.^2.*cB;
% calculation of total monomeric A and B (competent and incompetent)
cAtot = cA + cAincomp;

```

```

cBtot = cB + cBincomp;
% calculation of the signal average buoyant mass
num = MA*epsA*cAtot*bMA + MB*epsB*cBtot*bMB + ...
      (MA*epsA + MB*epsB)*(cAB1 + cAB2)*(bMA + bMB) + ...
      (2*MA*epsA + MB*epsB)*cA2B*(2*bMA + bMB);
den = MA*epsA*cAtot + MB*epsB*cBtot + ...
      (MA*epsA + MB*epsB)*(cAB1 + cAB2) + ...
      (2*MA*epsA + MB*epsB)*cA2B;
bMabsav = num./den;
y = bMabsav;
end
% -----
function y = solvecA(x)
% the root of this equation is the value of competent monomeric A that
% satisfies the conservation of mass equations
% x = cAcomp
global cAcomp cBcomp K1 K2 alpha
cBc = cBcomp./(1 + (K1 + K2)*x + alpha*K2*K2*x^2);
y = 2*alpha*K1*K2*cBc*x^2 + ((K1 + K2)*cBc + 1)*x - cAcomp;
-----

```

This model was fitted to the composition-dependent buoyant masses derived from the data obtained from the last scans performed at 7100 rpm. The solutions were centrifuged at 7100 rpm for the longest time, and I believe that these gradients are the closest to true equilibrium gradients. The results of the modeling are shown below:

BEST FIT PARAMETERS

P(1): $w_A(\text{constant}) = 0.25$ (CONSTRAINED)

P(2): $w_B(\text{constant}) = 0.4$ (CONSTRAINED)

P(3): $MA = 109442.3913$

P(4): $MB = 189228.8385$

P(5): $f_{Acomp} = 1$ (CONSTRAINED)

P(6): $f_{Bcomp} = 1$ (CONSTRAINED)

P(7): $\log K1 (M^{-1}) = 5.1591$

P(8): $K2/K1 = 0$ (CONSTRAINED)

P(9): $\alpha = 0$ (CONSTRAINED)

Best fit WSSR: 15489111.0195 DOF: 9

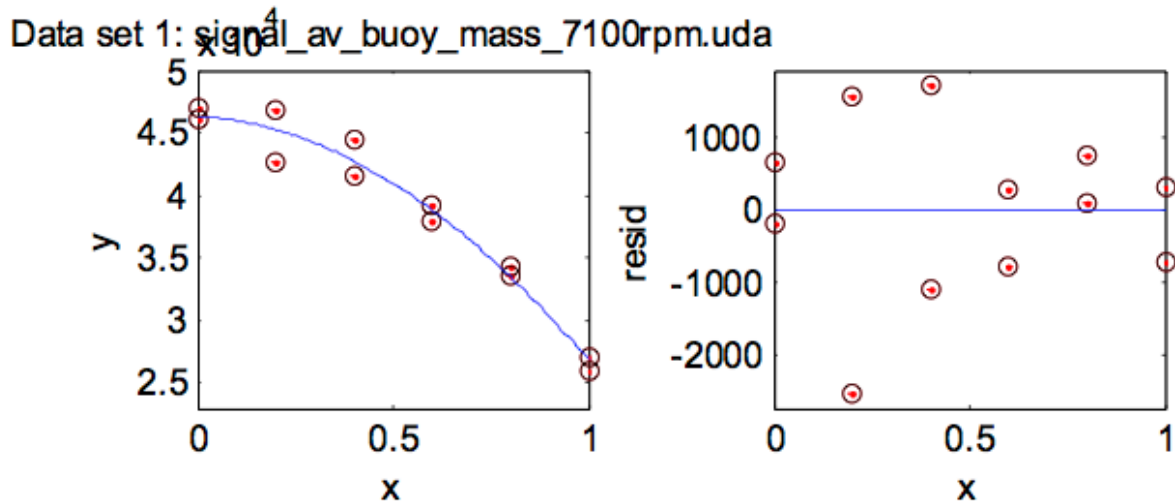
4

4.5 4 3.5 3 2.5

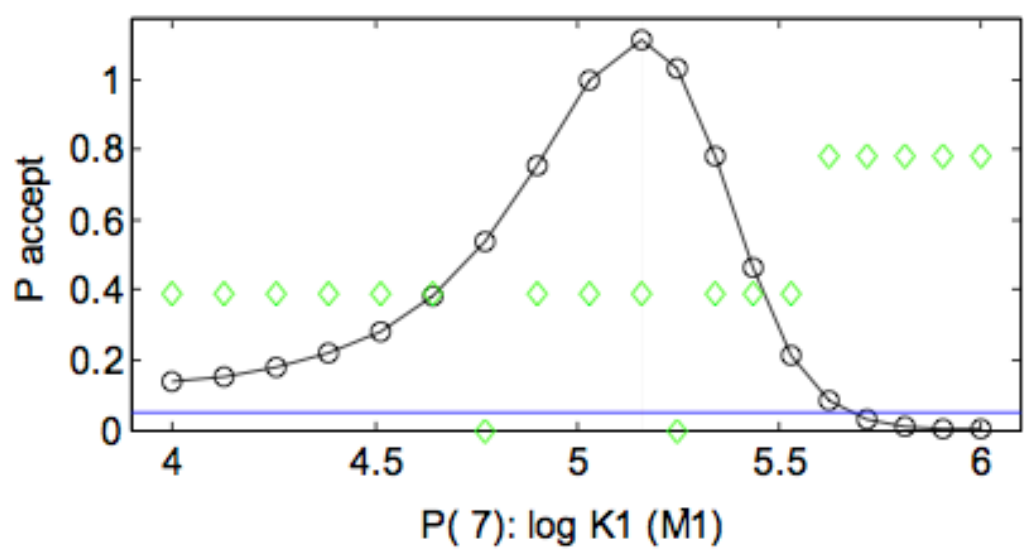
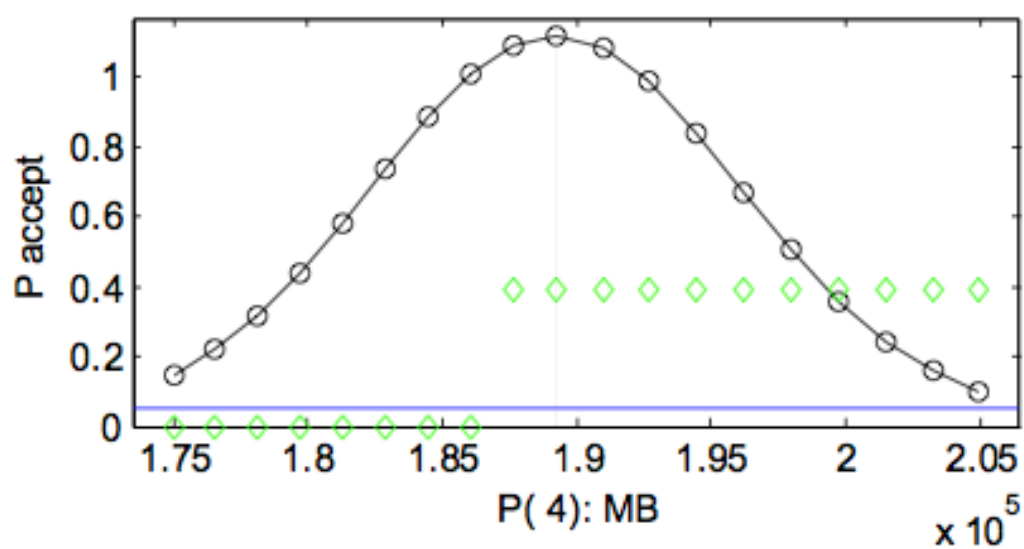
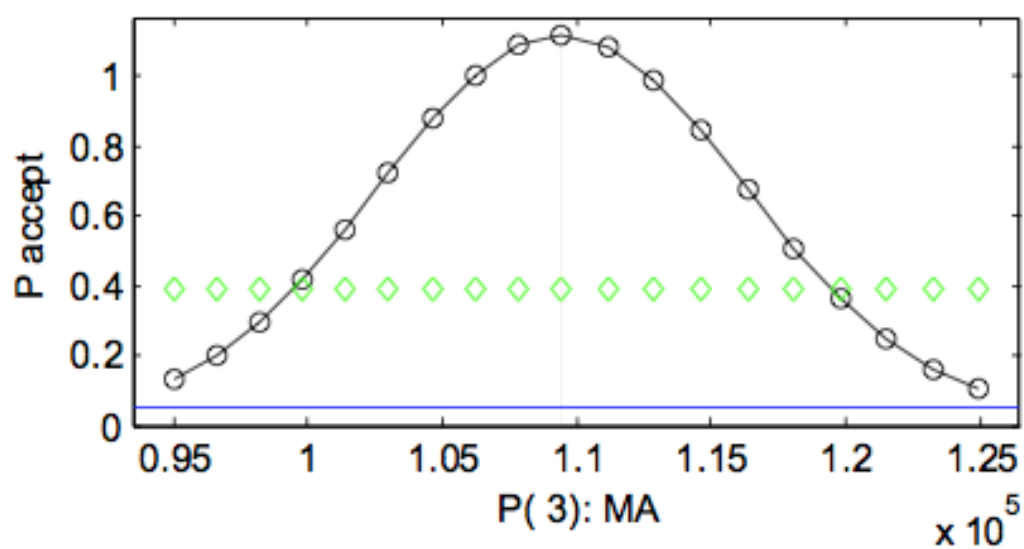
assumed fully competent assumed fully competent

1:1 model, no binding to second site same

Data set 1: signal_av_buoy_mass_7100rpm.uda 5 x 10



Relative goodness of fit as functions of the values of each adjustable parameter:



The 50% values correspond to + or – 1 standard error of estimate. So we could state that $MA = 109,400 \pm 8000$, $MB = 189,200 \pm 8000$, and $\log K = 5.2 +0.2, -0.4$, where the indicated uncertainties correspond to \pm one standard error of estimate.

The Calypso software does not provide estimates of the uncertainty of best-fit parameter values.

第四節 NADH oxidase- Prx 複合体解析

第一項 NADH oxidase の結晶構造解析

1. 結晶構造解析

Nox 結晶構造解析は奈良先端大学院大学 構造生物學研究室 北野健助教授との共同研究で行った。第四章 第一節 で精製した NADH oxidase を北野助教授へ送付し、解析を依頼した。

2. 結果

得られた NADH oxidase 結晶構造を Figure 4-4-1 に示す。

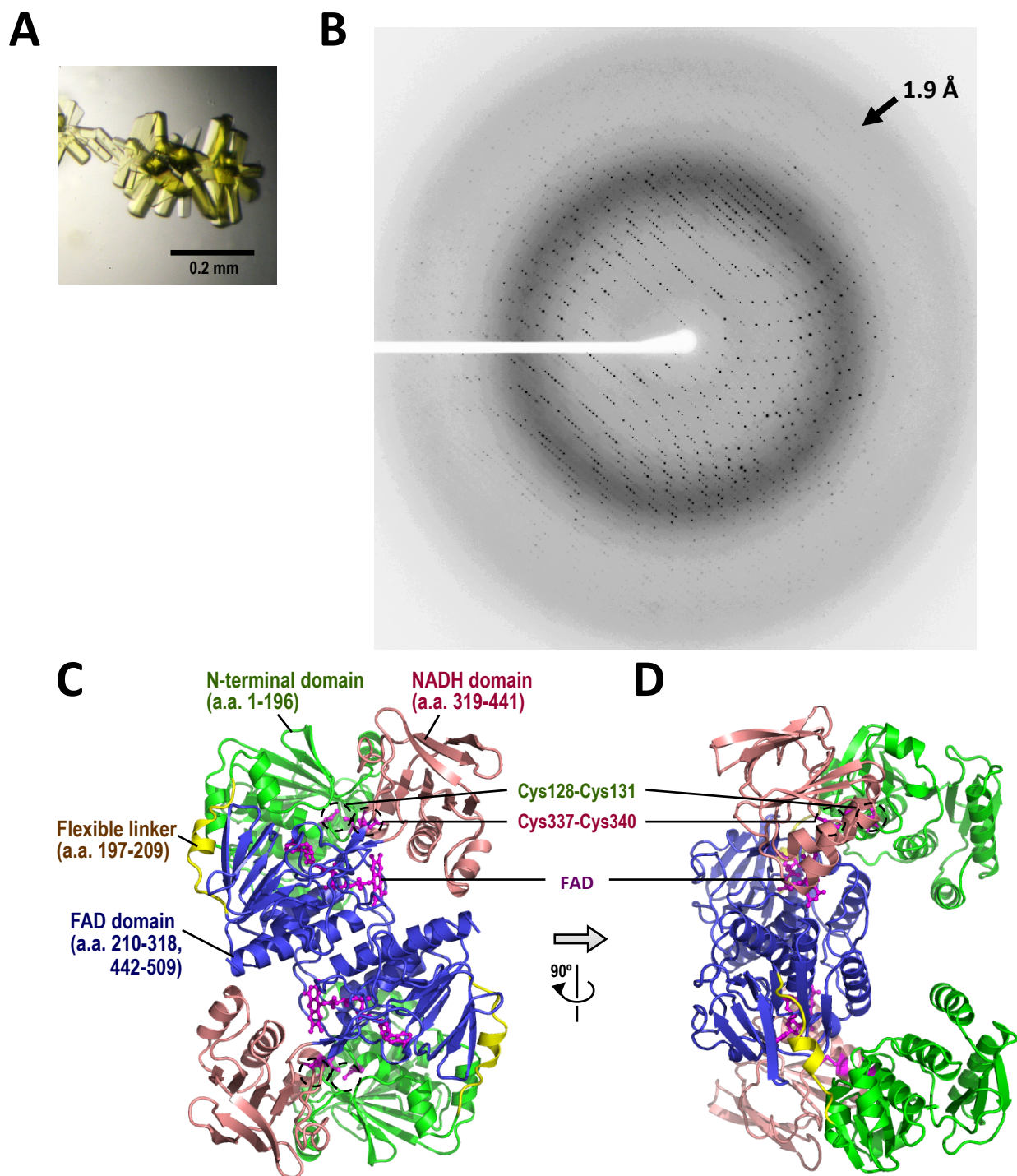


Figure 4-4-1. Crystallization and X-ray diffraction of *A. xylophilus* NOX. A: Crystals of *A. xylophilus* NOX wild-type. Crystallization screening was carried out by the vapor-diffusion method at 20°C using commercial screening kits (Hampton Research and Nextal Biotechnologies), where NOX was mixed in a 1:1 ratio with the reservoir solution. Optimized crystallization condition included 26% (w/v) polyethylene glycol 1000, 0.2 M magnesium acetate, and 0.1 M Bis-Tris-HCl (pH 6.9). B: X-ray diffraction image taken at the SPring-8 beamline BL44XU. C,D: Crystal structure of *A. xylophilus* NOX dimer. The NTD (green), shown with its redox-active dithiol (Cys128-Cys131), is connected by the flexible linker (yellow) to the FAD domain (blue), and the NADH/SS domain (pink) is depicted with its redox-active disulfide (Cys337-Cys340). The bound flavin cofactor in the FAD domain is also shown.

第二項 Small Angle X-ray Scattering による複合体構造解析

1. サンプルの調製

Nox, Prx 溶液を 300 mM 硫酸アンモニウム含有 pH 7.0 50 mM HEPES buffer と pH 7.0 50 mM HEPES buffer にて両タンパク質を別々に透析する。透析後に Nox, Prx を分子吸光係数 ($\epsilon_{450, 280} = 13,600, 25,800$) を用いて、それぞれ 14.3 mg / ml となるように調製する。Nox, Prx を 1 : 1, 1 : 5 となるように混合する (混合サンプルも濃度は 14.3 mg / ml となるようにする)。以上のサンプルに加え、0.43 μ m フィルターで濾過済みの buffer を作製する。全作製サンプルのまとめを Table 4-4-1 に示す。

Table 4-4-1. Summary of SAXS samples.

No.	Sample	Protein conc. (mg/ml)	Vol. (μl)	Exposure time (min)	Set number	Total exposure time (min)
1	pH 7.0 50 mM HEPES	-	30	15	12	180
2	Complex 5:1	14.3	30	15	8	120
3	Complex 1:1	14.3	30	15	8	120
4	Prx	14.3	30	15	12	180
5	Nox	14.3	30	15	12	180
6	pH 7.0 50 mM HEPES containing 300 mM AS	-	30	15	12	180
7	Complex 5:1 AS	14.3	30	15	12	180
8	Complex 1:1 AS	14.3	30	15	12	180
9	Prx AS	14.3	30	15	12	180
10	Nox AS	14.3	30	15	12	180

2. Small Angle X-ray Scattering 解析

ここからの実験は株式会社 Rigaku にて松本崇氏と行った。調製したサンプルを遠心フラッシュ後に Bio SAXS-1000 へ装填し、測定した。測定後、SAXSLab を用いて円周平均を行い、Primus (ATSAS)により、各タンパク質溶液散乱曲線よりバックグラウンドである緩衝液散乱曲線を引き算し、各タンパク質由来の散乱曲線の算出を行った。各 X 線散乱曲線を用いて Guinier プロット解析を行った。各濃度タンパク質の X 線散乱曲線より算出した分子量に依存する原点散乱強度 $I(0)$ 、慣性半径(分子の重心からの広がりを表すパラメーター)と D_{\max} を Gnom(ATSAS)を用いて計算した。解析に用いた ATSAS 等のプログラムは European Molecular Biology Laboratory (EMBL) よりダウンロード可能である。
<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>

3. 結果

SAXSLab を用いて円周平均を行い、Primus (ATSAS)により、各タンパク質溶液散乱曲線よりバックグラウンドである緩衝液散乱曲線を引き算し、各タンパク質由来の散乱曲線を Figure 4-4-2 に示す。得られた散乱曲線より Guinier プロット解析を行った結果を Figure 4-4-3 に示す。原点散乱強度 $I(0)$ 、慣性半径(分子の重心からの広がりを表すパラメーター)と D_{\max} (分子の最大長)を Table 4-4-2 に示す。各値は $q=0.68\text{\AA}^{-1}$ までのデータを使用し Gnom(ATSAS)を用いて計算を行った。以上の計算により得られた各サンプルのビーズモデルを Figure 4-4-4 に示す。

Table 4-4-2. Summary of beads modeling parameters.

No.	Sample	Inertial radius (\AA)	D_{\max} (\AA)	$I(0)$
1	Complex 5:1	33.7 (27.4)	122.5	0.13 (0.11)
2	Complex 1:1	34.0 (27.9)	214	0.19 (0.19)
3	Prx	30.4 (25.9)	115	0.09 (0.08)
4	Nox	35.2 (29.2)	111	0.15 (0.11)
5	Complex 5:1 AS	64.2 (64.3)	214	0.19 (0.19)
6	Complex 1:1 AS	35.3 (27.9)	106.5	0.10 (0.06)
7	Prx AS	47.2 (45.3)	121.5	0.21 (0.20)
8	Nox AS	35.8 (35.5)	122	0.12 (0.12)

() means that number calculated AutoRg in range of $R_g < 1.2$.

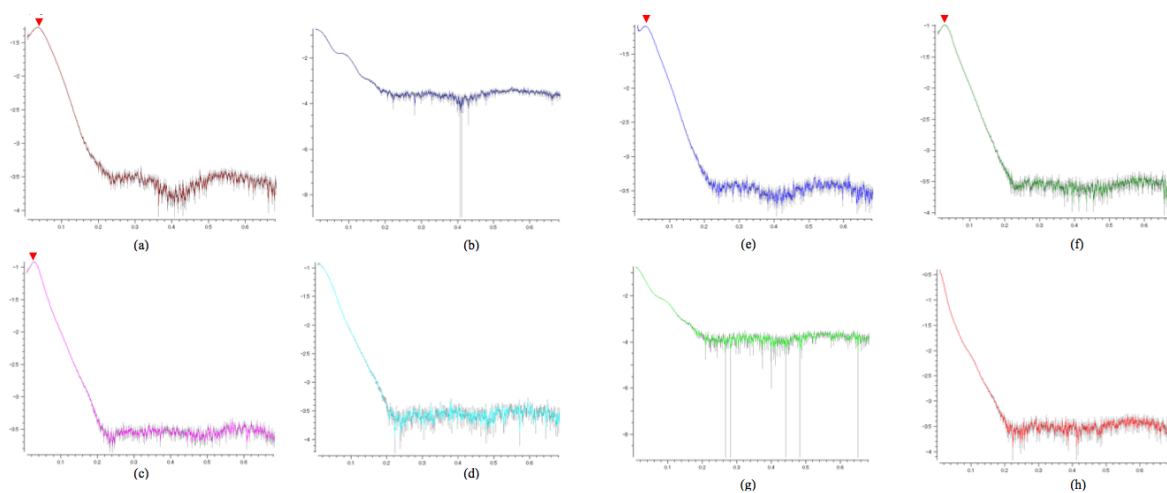


Figure 4-4-2. X-ray Scattering curve of each sample. a: Prx, b: Prx AS, c: Nox, d: Nox AS, e: Complex 5:1, f: Complex 1:1, g: Complex 5:1AS, h: Complex 1:1AS

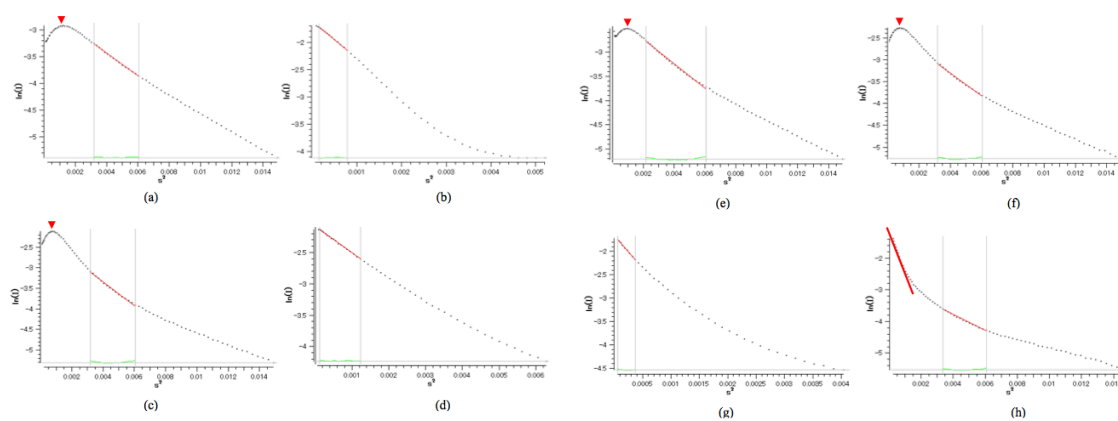


Figure 4-4-3. Guinier plot of each sample. a: Prx, b: Prx AS, c: Nox, d: Nox AS, e: Complex 5:1, f: Complex 1:1, g: Complex 5:1AS, h: Complex 1:1AS

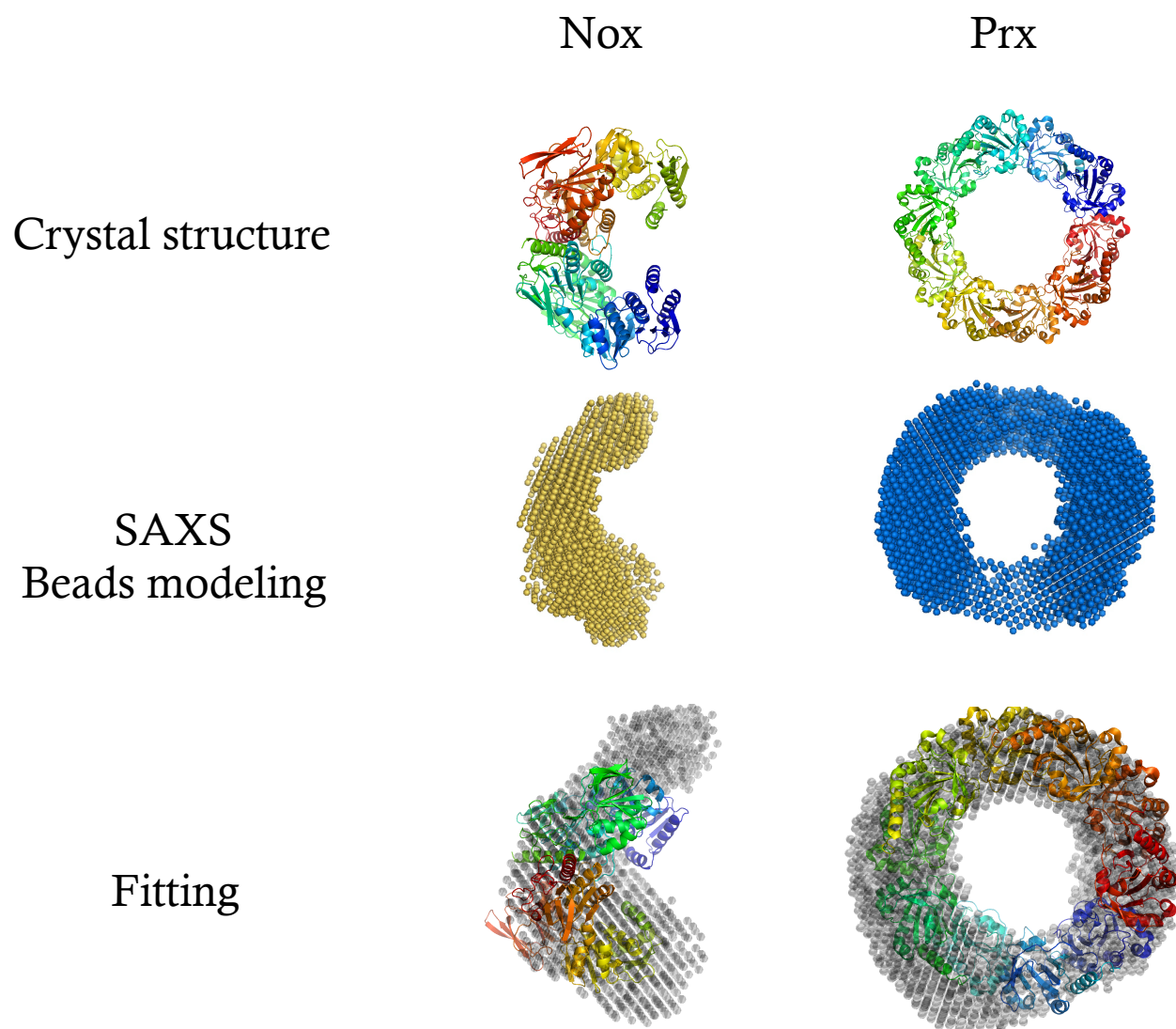
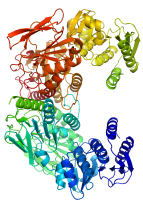
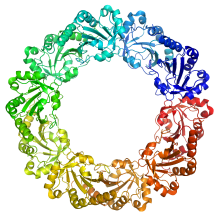
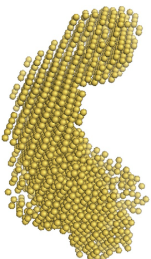
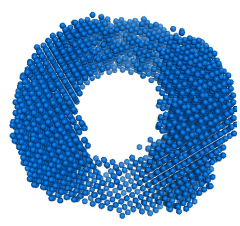



Figure 4-4-4. Summary of our structure analysis.

第五節 小括

本章での解析で求められた Nox, Prx の分子量と構造モデルを併せて Table 4-5-1 に示す。

Table 4-5-1. Summary of previous analysis about Nox-Prx complex

	Nox : 2mer (kDa)	Prx : 10 mer (Kda)	Complex (kDa)	$K_{D(\mu M)}$
Theoretical value	109.954	207.74	?	?
MW analysis				
				24 ±
Surface Plasmon Resonance	-	-	-	7
Dynamic Light Scattering	≒ 100	≒ 200	≒ 300	
Analytical ultracentrifuge				
Sedimentation Velocity	-	153.272	-	-
Sedimentation Equilibrium	95.626	164.472	-	-
Short column Sedimentation				
Equilibrium	109.4423913	189.2288385		
Static Light scattering	105.9	201.7	413,5	7.08
Blue Native PAGE			≒ 311	
Structure analysis				
Crystal structure			?	
Beads modeling				

静的光散乱法を用いた解析の結果、Nox, Prx がそれぞれ 2 量体と 10 量体にオリゴマー化し、緩く複合体を形成することを明らかにした。また、小角散乱法を用いた解析の結果、Nox-Prx 複合体構造モデルを初めて得た。これらの解析より、Nox-Prx の高速反応性は 2 タンパク質間の緩い複合体形成が重要であることが推定される。Nox:Prx の結合比が 2:1 であるとする、複数の活性中心の近接が鍵であることが推察される。複数の活性中心が近接を証明するために、現在小角散乱法にて得られたビーズモデルに結晶構造のフィッティングを試みている。この仮説を証明する為に、変異体または還元状態での構造解析と酵素反応解析の相関した解析が必要である。

第五章 *Amphibacillus xylanus* の好気代謝経路の検討

序論

これまでの解析により、*A. xylanus* の酸素代謝は Nox-Prx 系と遊離フラビン、NPO が関与していることを推定し、Nox-Prx 系の高速反応機構について解析を試みてきた。本章では *A. xylanus* の酸素代謝に於いて主要な Nox-Prx 系の一般微生物界における分布解析と、遺伝子比較解析から *A. xylanus* の有する酸素代謝系について考察する。

第一節 NADH oxidase-Prx の微生物界における分布の解析

第一項 生化学データによる解析

1. ターゲットタンパク質の選定

Nox-Prx は、Nox による酸素還元と Nox, Prx が共同した過酸化物分解反応を触媒することが知られている。そこで本解析では、Nox-Prx 以外の酸素代謝、過酸化物分解酵素系として、呼吸鎖、H₂O forming NADH oxidase, NADH peroxidase, Catalase の分布も同時に探索した。各酵素の特徴を以下に、触媒反応のまとめを Table 5-1-1 に示す。

Table 5-1-1. Main oxygen-metabolizing enzyme system discussed in this section.

Enzyme or enzyme system	Reaction	Comments
Catalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Uses H_2O_2 as substrate, heme- or Mn-catalase
NADH peroxidase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	Uses H_2O_2 as substrate
H_2O forming NADH oxidase	$\text{O}_2 + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+$	H_2O -producing NADH oxidase
NADH oxidase	$\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD}^+$	H_2O_2 -producing NADH oxidase
NADH oxidase (Nox)-AhpC(Prx)	$\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NAD}^+$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	Uses O_2 , and H_2O_2 and ROOH^* as substrate
Alkyl hydroperoxidase (AhpF)-AhpC(Prx)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	Uses H_2O_2 and ROOH^* as substrate

*Alkyl hydroperoxide.

1-1. Nox or AhpF – AhpC (Prx)

AhpF-AhpC(Prx)は過酸化アルキル分解酵素として *Salmonella enterica* (呼吸鎖、カタラーゼを有するグラム陽性好気性菌) にて同定された[29]。一方で NADH oxidase (Nox)-Prx は *Amphibacillus xylanus* で酸素代謝、過酸化物分解の両方に寄与し得る酵素として同定された[30]。AhpF-AhpC と Nox-Prx との大きな違いは酸素への反応性で、Nox-Prx の方が酸素に対する反応性が高い。

1-2. Catalase, NADH peroxidase

Catalase は呼吸鎖を有する絶対好気性菌において広く存在が知られており[31]、過酸化水素を水と酸素へ分解する反応を職位倍する。絶対好気性菌においては補因子としてヘムを要求するものが一般的だが、一部の乳酸菌においては Mn を補因子として結合する pseudocatalase の存在も報告されている[32]。

NADH peroxidase は呼吸鎖、経無合成能を欠如した酸素耐性菌において見つかり、過酸化水素を水へと還元する反応を触媒する。

過酸化水素解毒酵素は一般に、単一で機能する酵素として知られるが、絶対嫌気性菌の中には複合酵素系により過酸化水素を分解するものも知られている。

1-3. H₂O forming NADH oxidase

本酵素は主に、呼吸鎖を欠如した酸素耐性菌を中心に見つかり、単一で機能する酵素である。NADH peroxidase 同様に、一部の嫌気性菌は複合酵素系により本触媒反応を行うものが報告されている。

2. バクテリアの選定

バクテリアを、酸素代謝の観点から、大きく 4 分類（絶対好気性菌、偏性嫌気性菌、酸素耐性菌、絶対嫌気性菌）した。4 分類のなかで代表的な菌を[21]を参照に、選定した。選定したバクテリアを Table 5-1-2 に示す。

Table 5-1-2. Selected bacteria in this analysis

Propety	Bacteria
Having a respiratory chain	
Obligate aerobic bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Xanthomonas compestris</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i> <i>Alkaliphilic bacillus</i> <i>Alcaligenes faecalis</i>
Facultatively anaerobic bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
Lacking a respiratory chain	
Aerotolerant anaerobic bacteria	<i>Amphibacillus tropicus</i> <i>Amphibacillus xylanus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus species</i> ² <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Obligate anaerobic bacteria	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides vulgatus</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium species</i> ³ <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Desulfovivrio gigas</i> <i>Clostridium aminovalericum</i> <i>Clostridium butyricum</i>

3. 文献検索

文献検索によるターゲット酵素の探索は Bergey's Manual systematic microbiology と Scopus (<http://www.scopus.com/home.url>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Scifinder (<https://scifinder.cas.org>)による文献検索を用いた。

4. 結果

呼吸鎖は好気性菌、偏性嫌気性菌呑みに分布した。H₂O-forming NADH oxidase は、NADH peroxidase は酸素耐性菌と嫌気性菌に分布した。catalase は主に好気性菌と偏性嫌気性菌に分布した。

呼吸鎖の有無、酸素存在下での生育にかかわらず、4分類したすべてのクラスターで Nox(AhpF)-Prx(AhpC)を有するバクテリアの存在が明らかとなった (Table 5-1-3)。

Table 5-1-3. Oxygen metabolizing and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bacteria based on the published biochemical data^a.

Strain	O ₂ metabolism		H ₂ O ₂ scavenging		Nox- or AhpF- Ahpc (Prx)	
	H ₂ O producing oxidase	NADH	Catalase ³	NADH peroxidase	Present	<i>t</i> -Butyl hydroperoxide reductase activity (mU / mg) ⁴
Having a respiratory chain						
Obligately aerobic bacteria						
<i>Bacillus subtilis</i> 168	ND		+	ND	5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NRIC 1114T	ND		+	ND	ND	1.1
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	ND		+	ND	6	ND
<i>Alcaligenes faecalis</i> NRIC 1001T	ND		+	ND	ND	14
Facultatively anaerobic bacteria						
<i>Bacillus licheniformis</i> NRIC 1863	ND		+	ND	+	46.4
<i>Escherichia coli</i> NRIC 1509	ND		+	ND	7	7.4
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ND		+	ND	8	4
Lacking respiratory chain						
Aerotolerant bacteria						
<i>Amphibacillus tropicus</i> DSM 1387T	-		-	-	9	ND
<i>Amphibacillus xylanus</i> JCM 7361T	-		-	-	10	574.7
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NRIC 1149T	12		-	11	12	1
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> NRIC 1133T	-		-	-	13	8.4
<i>Streptococcus agalactiae</i> NEM316	ND		-	ND	14	ND
<i>Streptococcus mutans</i> NBRC11713	15		-	ND	16	ND
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	18		P	17	ND	ND
<i>Lactobacillus brevis</i> DSM20054	19		-	ND	ND	ND
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	ND		-	ND	ND	1.1
<i>Lactobacillus plantarum</i> ¹	21		P	20	ND	ND
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC27651	22		-	ND	ND	ND
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KSM 1101	23		-	ND	ND	ND
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> NRIC	ND		+	ND	ND	0.8
Obligately Anaerobic bacteria						
<i>Bacteroides fragilis</i> 683R	ND		+	ND	24	ND
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM 5826T	ND		+/-	ND	ND	0.03
<i>Porphyromonas gingivalis</i> M50	ND		-	25	26	ND
<i>Bifidobacterium bifidum</i> JCM 1255T	ND		-	ND	ND	2
<i>Bifidobacterium species</i> ²	ND		-	27.28	ND	ND
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	M ³⁰		-	M ²⁹	ND	ND
<i>Clostridium aminovalericum</i> DSM 1283T	31		-	ND	ND	1.9
<i>Clostridium butyricum</i> JCM 1391T	ND		-	ND	ND	1.6
<i>Desulfovibrio gigas</i> NCIMB 9332	M ³³		+	M ³²	ND	ND

^aSymbols: ND, no data; +, positive; -, negative; +/-, some strains are positive, some strains are negative; M, multi enzymes complex; P, pseudocatalase

¹ATCC14917, P5, 10S

²*B. infantis*, *B. lactis*, *B. pseudolongum*, *B. longum* and *B. breve* was reported.^{27, 28}

³Based on Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, Volume 4.

⁴[21].

⁵[33]. ⁶[34]. ⁷[35]. ⁸[29]. ⁹[36]. ¹⁰[30]. ¹¹[37]. ¹²[38]. ¹³[39]. ¹⁴[40]. ¹⁵[41]. ¹⁶[42]. ¹⁷[43]. ¹⁸[44]. ¹⁹[45]. ²⁰[46]. ²¹[47]²²[48]. ²³[49]. ²⁴[50]. ²⁵[51]. ²⁶[52].
²⁷[53]. ²⁸[54]. ²⁹[55]. ³⁰[56]. ³¹[7]. ³²[57]. ³³[58].

第二項 ゲノムデータによる解析

1. 使用データベースの選定

ゲノムデータを用いた解析には一般的なデータベースである Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): <http://www.genome.jp/kegg/> を基軸として行った。

2. ゲノムデータによる解析

選択したデータベースを用いて対象菌株のゲノム情報を検索し、対象タンパク質名がアノテーションされたものをすべてピックアップした。

3. 結果

第五章 第一節 第一項の生化学的な解析結果に併せて、ゲノムデータベースを用いた検索の結果を Table 5-1-4 に示す。今回 4 分類したすべてのクラスターで Nox(AhpF)-Prx(AhpC)の存在が明らかとなった。

Table 5-1-4. Oxygen metabolizing and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bacteria based on published biochemical and genomic data^a.

Species	Growth ⁴		O ₂ metabolism			H ₂ O ₂ scavenging				Nox- or		PDH		
	Anaerobic	Aerobic	Respiratory chain ⁴	H ₂ O producing		Catalase ⁴	NADH peroxidase		AhpF- Ahpc (Prx)		complex			
				NADH oxidase					b	g	b	g	b	g
Having a respiratory chain														
Obligately aerobic bacteria														
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	ND	-	+	ND	-	ND	+	ND	+		
<i>Xanthomonas compestris</i>	-	+	+	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	+	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
<i>Alkaliphiric bacillus</i>	-	+	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
Facultatively anaerobic bacteria														
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	+	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	+	+	+	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	+		
Lacking respiratory chain														
Aerotolerant bacteria														
<i>Amphibacillus tropicus</i>	+	+	-	-	ND	-	-	ND	+	ND	+ ⁵	ND		
<i>Amphibacillus xylanus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+ ⁶	+		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	-	+	ND	-	+	+	+	+	ND	+		
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	+	+	-	-	ND	-	-	ND	+	ND	+ ⁷	ND		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	+	-	ND	?	-	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	-	+	+	-	ND	-	+	+	ND	+		
<i>Streptococcus</i> species ²	+	+	-	ND	?	-	ND	+/-	ND	+	ND	+		
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	-	+	ND	P	+	+	ND	-	ND	+		
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	-	+	ND	-	ND	+	ND	-	ND	+		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	weak	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	-	+	ND	P	+	+	ND	-	ND	+		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	+	ND	-	ND	+	ND	-	ND	+		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	-	ND	-	P	ND	+	ND	-	ND	+		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	-	ND	+	-	ND	-	ND	-	ND	+		
<i>Zymomonas mobilis</i>	+	+	-	ND	?	+	ND	-	ND	-	ND	+		

<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	+	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
---------------------------------------	---	---	---	---	----	---	----	----	----	----	----	----

Obligately Anaerobic bacteria

<i>Bacteroides fragilis</i>	+	-	-	ND	-	+	ND	-	+	+	ND	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+	-	-	ND	-	+/-	ND	-	ND	+	ND	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	-	-	ND	-	-	ND	¹	+	+	ND	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	+	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	-	-	M	ND	-	M	ND	ND	-	ND	-
<i>Bifidobacterium species</i> ³	+	-	-	ND	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Clostridium aminovalericum</i>	+	-	-	+	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Clostridium butyricum</i>	+	-	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Desulfovivrio gigas</i>	+	-	-	M	ND	+	M	ND	ND	ND	ND	ND

^aSymbols: ND, no data; +, positive; -, negative; +/-, some strains are positive, some strains are negative; P, pseudocatalase (Mn - catalase); M, multi enzymes complex; ?, contains NADH oxidase but its products are unknown.

b, data from biochemical analysis; g, data from genome analysis

¹Activity was detected in cell free extracts but the gene of NADH peroxidase was not found (Diaz, P.I. et al. 2004a).

²*S. dysgalactiae*, *S. gallolyticus*, *S. parauberis*, *S. pasteurianus*, *S. salivarius*.

³*B. infantis*, *B. lactis*, *B. pseudolongum*, *B. longum* and *B. breve* were reported (Shimamura, S. et al. 1992. A. Talwalkar and K. Kailasapathy 2003.).

⁴Based on Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition, Volume4.

⁵[36]

⁶[59]

⁷[39]

第三項 系統解析

1. 選定バクテリアの 16S rRNA 系統解析と酵素分布

第五章 第一節 第一、二項で作製した酵素分布を、16S rRNA の系統樹に併せて表示した(Figure 5-1-1)。Nox-Prx 系は系統樹に於いても広い範囲に分布することが明らかとなった。



Figure 5-1-1. Relationship between enzymes for O₂-metabolizing and H₂O₂-scavenging enzymes and the phylogenetic tree of bacteria based on the 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values based on 1000 replications are given as percentages at branching points; only values greater than 50 % are shown. The bar represents the unit length of the number of nucleotide substitution

2. Nox (AhpF)-Prx(AhpC)の系統進化樹の作成

Nox (AhpF)-Prx(AhpC)は系統樹の観点からもバクテリア界に広く分布していることが明らかとなったため、タンパク質アミノ酸配列より作製した進化系統樹と、16S rRNA の系統樹の比較を試みた。系統樹の作製は第五章 第二節 第一項に準じて作製した。配列データは KEGG、または NCBI データベースより取得した。

3. 結果・考察

タンパク質アミノ酸配列より作製した進化系統樹と 16S rRNA 配列より作製した系統樹を Figure 5-1-2 に示す。二つの系統樹を比較したところ、Nox, Prx とともに 16S rRNA と相関性を示すことが明らかとなった。この相関性はパラログの少ない Nox に、より顕著に現れている。酸素代謝、過酸化水素分解への寄与が明らかとなっている Nox (AhpF)-Prx(AhpC)の系統進化樹が 16S rRNA の系統樹と相関性を示すという発見は興味深い。*A. xyloxydans* の好気代謝への寄与が推定されている PDH complex のアミノ酸配列ではこのような相関性を示さなかった (data not shown)ことから、この相関性は保存性の高いタンパク質に共通した事象では無いことが示唆される。現在我々はこの相関性を、酸素がバクテリアの進化に影響を与えた、との説を支持する事象ではないかと考察している。本考察の検討の為に、更なる解析が望まれる。

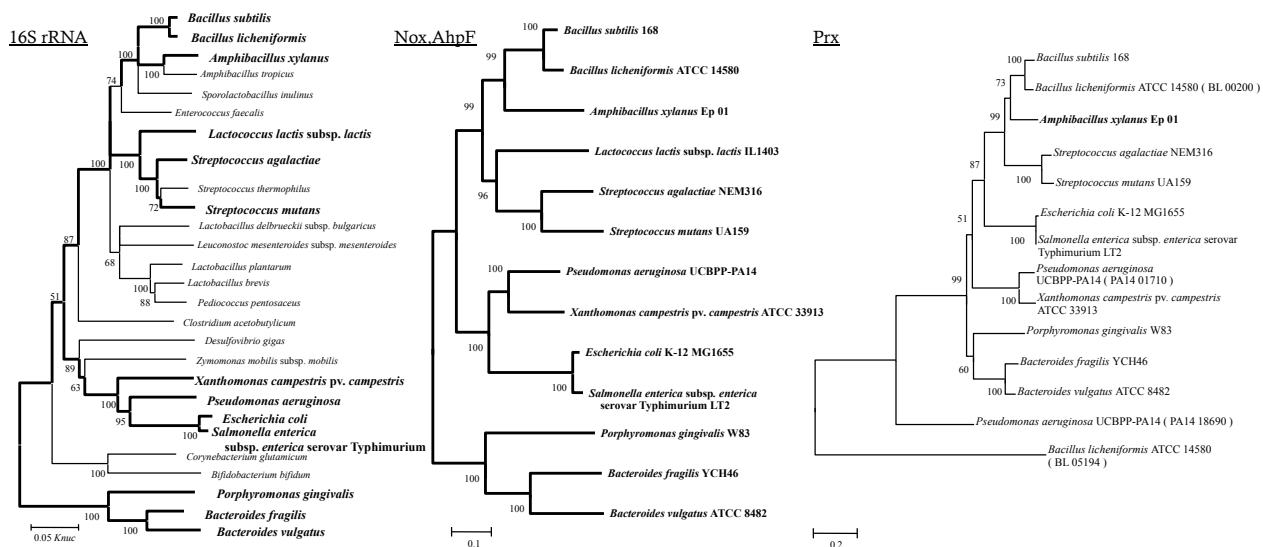


Figure 5-1-2. Evolutionary tree of bacteria based on amino acid sequence of (A) AhpC (Prx) and (B) NADH oxidase and AhpF. Bootstrap values based on 1000 replications are given as percentages at branching points; only values greater than 50 % are shown. The bar represents the unit length of the number of amino acid substitutions

第二節 他菌種との比較解析

第一項 系統樹の作製

ゲノム解析により推定した代謝経路の有無、また *A. xylanus* ゲノムを特徴付けるため、他菌種との比較解析を試みた。比較解析にあたり、*A. xylanus* の属する HA グループの系統樹を作製した。

1. ゲノムデータの取得

本解析に利用したゲノムデータは独立行政法人 NITE とのプロジェクトにより設立された、*Amphibacillus xylanus* Ep01 アノテーションサイト(OCSS: https://www.bio.nite.go.jp/ocss/v2_ext/main_window.php) と、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) を利用した。OSCC を使用する際は利用の際は NITE への申請が必要である。本申請は新村洋一教授を介して行う。それぞれのサイト使用に際して、以下の資料またはサイトを参照した。

OCSS: [6], GenBank&DDBJ: <http://togotv.dbcls.jp/ja/>

系統樹作製には .fasta 形式で保存されたデータファイルが必要になる。ゲノム解析により得られたデータより、*A. xylanus* ゲノムの一般的な特徴を Table 5-2-1 に示す。

Table 5-2-1. General properties of *Amphibacillus xylanus* genome.

	<i>Amphibacillus xylanus</i> NBRC15112 ^T	<i>Bacillus subtilis</i> 168 *
Genome size	2,569,486	4,214,630
G + C contents	35.72%	43.52%
Protein coding	2,411	4,106
Growth		
Oxygen req.	-	+
pH range	Alkaline (8 - 10) ^a	neutral
NaCl rate (%)	< 6 ^a	< 7 ^b

^aNiimura Y., et al., Int. J. Syst.Bacteriol., 40, 297-301(1990)

^bNakamura L. K., et al.Int. J.Syst. Bacteriol. 49. 121-1215 (1999)

* <http://www.jgi.doe.gov/>

A. xylanus 近縁種として、35 種、アウトグループとして *Bucillus subtilis* 168 を選定した。選択菌株の詳細を Table 5-2-2 にて示す。

Table 5-2-2. The selected strains for the phylogenetic tree.

Genus	Species	Strain	Accession No.
<i>Natronobacillus</i>	<i>azotifigens</i>	24KS-1T	EU143681
<i>Amphibacillus</i>	<i>tropicus</i>	Z-7792T	AF418602
<i>Amphibacillus</i>	<i>jilinensis</i>	Y1T	FJ169626
<i>Amphibacillus</i>	<i>sediminis</i>	Shu-P-Ggiii25-3T	AB243866
<i>Amphibacillus</i>	<i>fermentum</i>	Z-7984T	AF418603
<i>Streptohalobacillus</i>	<i>salinus</i>	H96B60T	FJ746578
<i>Halolactibacillus</i>	<i>halophilus</i>	M2-2T	AB196783
<i>Halolactibacillus</i>	<i>miurensis</i>	M23-1T	AB196784
<i>Halolactibacillus</i>	<i>alkaliphilus</i>	H-5T	EF554593
<i>Paraliobacillus</i>	<i>ryukyuensis</i>	O15-7T	AB087828
<i>Paraliobacillus</i>	<i>quinighaensis</i>	YIM-C158T	EU135728
<i>Gracilibacillus</i>	<i>halotolerans</i>	NNT	AF036922
<i>Gracilibacillus</i>	<i>dipsosauri</i>	DD1T	X82436
<i>Cerasibacillus</i>	<i>quisquiliarum</i>	BLx1T	AB107894
<i>Virgibacillus</i>	<i>pantothenticus</i>	IAM11061T	D16275
<i>Lentibacillus</i>	<i>salicampi</i>	SF-20T	AY057394
<i>Halalkalibacillus</i>	<i>halophilus</i>	BH2T	AB264529
<i>Piscibacillus</i>	<i>salipiscarius</i>	RBUI-1T	AB194046
<i>Filobacillus</i>	<i>milosensis</i>	SH714T	AJ238042
<i>Tenuibacillus</i>	<i>multivorans</i>	28-1T	AY319933
<i>Aquisalibacillus</i>	<i>elongatus</i>	SH4sT	AM911047
<i>Alkalibacillus</i>	<i>haloalkaliphilus</i>	DSM5271T	AJ238041
<i>Marinococcus</i>	<i>holophilus</i>	DSM20408T	X90835
<i>Sinobaca</i>	<i>quinghaiensis</i>	YIM70212T	DQ168584
<i>Thalassobacillus</i>	<i>devorans</i>	G-19.1T	AJ717299
<i>Salinimicrobium</i>	<i>album</i>	DSM20748T	X90834
<i>Halobacillus</i>	<i>halophilus</i>	NCIMB9251T	X62174
<i>Halobacillus</i>	<i>litoralis</i>	SL-4T	X94558
<i>Salinibacillus</i>	<i>aidingensis</i>	25-7T	AY321436
<i>Pontibacillus</i>	<i>chungwhensis</i>	BH030062T	AY553296
<i>Oceanobacillus</i>	<i>iheyensis</i>	HTE931T	AB010863
<i>Pausisalibacillus</i>	<i>globulus</i>	B22T	AM114102
<i>Ornithinibacillus</i>	<i>bavariensis</i>	WSBC24001T	Y13066
<i>Terribacillus</i>	<i>saccharophilus</i>	002-048T	AB243845
<i>Salirhabdus</i>	<i>euzebyi</i>	CVS-14T	AM292417
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	NCDO1769T	X60646

2. 系統樹作製

系統樹作製には CLUSTALW、MEGA5 と呼ばれる二つのソフトを用いた。それぞれのソフトは <http://www.clustal.org>, <http://www.megasoftware.net> ウェブサイトにてフリーでダウンロード可能である。使用方法はそれぞれ[60, 61]を参照する。

選定したバクテリアの 16S rRNA 配列の---.fasta ファイルを CLUSTALW を用いてアライメントを整える。CLUSTALW にてアライメントを整えた新しいファイル---.aln を MEGA5 にて---.meg ファイルに変換する。---.meg ファイルを基に系統樹を作製する。系統樹は近隣結合法 (neighbor-joining method)を用いて計算した。なお、統計検定は Bootstrap 法を選択し、繰り返しの計算は 1,000 回行うように設定した。作製された系統樹を Figure 5-2-1 に示す。

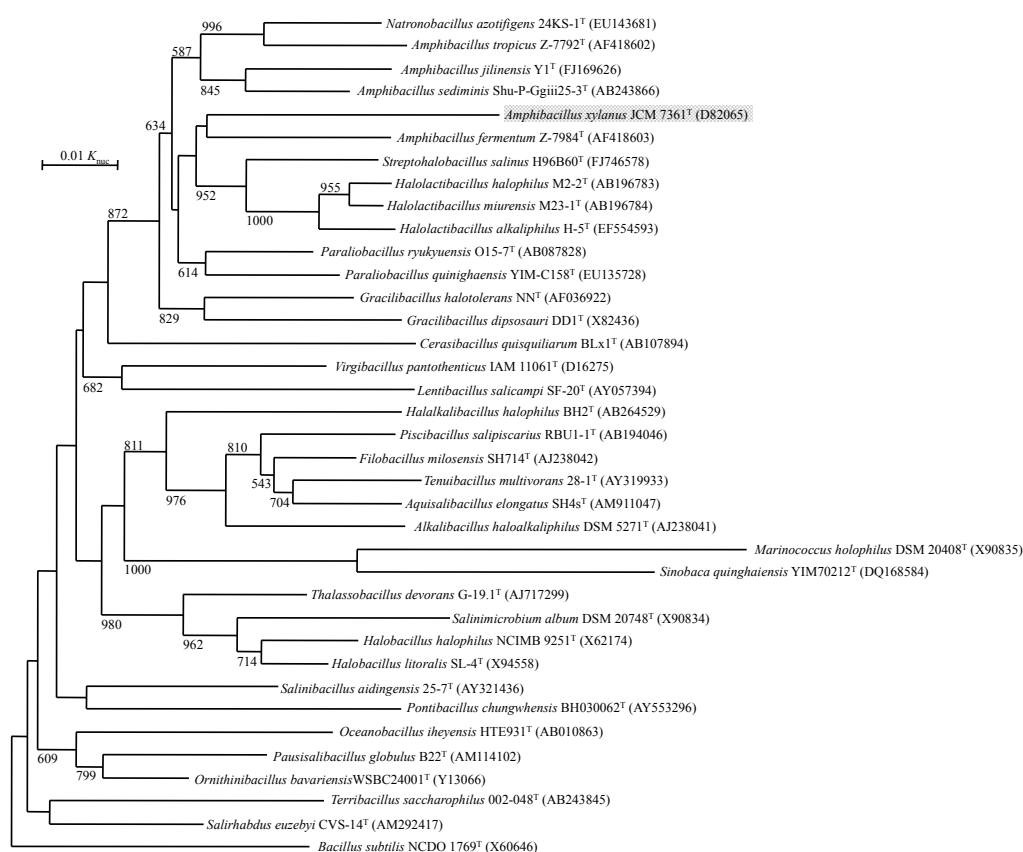


Figure 5-2-1. The phylogenetic relationship of *Amphibacillus* species and its relatives of the *Bacillus* HA group. Bootstrap values based on 1000 replications are given as percentages at branching points; only values greater than 50% are shown. The bar represents the unit length of the number of nucleotide substitution.

第二項 シンテニー解析

1. ゲノムデータの取得

第一章 第一節 第二項にて用いたデータベースを用いて、complete genome の配列データを.gb 形式で取得する。近縁種のなかでゲノムデータが利用可能であるものは *Halobacillus halophilus* DSM2266 と *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 の2菌株のみであった。本2菌株を含め、シンテニー解析に用いた菌株情報を Table 5-2-3 に示す。

Table 5-2-3. The selected strains for synteny analysis.

Genuses	Species	Strains	Accession No.
<i>Amphibacillus</i>	<i>xylanus</i>	Ep01	NC_018704.1
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	168	NC_000964.3
<i>Bacillus</i>	<i>pseudofirmus</i>	OF4	NC_013791.2
<i>Halobacillus</i>	<i>halophilus</i>	DSM2266	NC_017668.1
<i>Oceanobacillus</i>	<i>iheyensis</i>	HTE831	NC_004193.1

2. シンテニー解析

シンテニー解析に用いたソフトは、Genome matcher を用いた。本ソフトはフリーでダウンロード可能である

(<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html>)。なお、ダウンロードにあたり、氏名、所属、アドレスの登録が必要。使用マニュアルは上記サイト中にあるため、上記サイトを参照した。

Genome matcher を立ち上げ、genbank 形式のファイルを X 軸、Y 軸で開く。解析は CDSs(x) vs CDSs(y)で行った。本解析はすべての ORF に対して、総当たりでブラスト解析を行う手法である。

3. 結果・考察

解析結果を Figure 5-2-2 に示す。シンテニー解析より、*A. xylanus* は比較菌株と高いシンテニーを示すことが見いだされた。シンテニーを示す領域には複製、転写、翻訳に関与する遺伝子群が多く認められた。このようなシンテニーは第一章にて、多くの基幹代謝経路が KEGG を用いた検討により存在の推定を行えたことから妥当である。これより、*A. xylanus* の解析した基幹代謝経路のみならず、未解析な代謝経路に於いても *B. subtilis* との共通性が推察される。

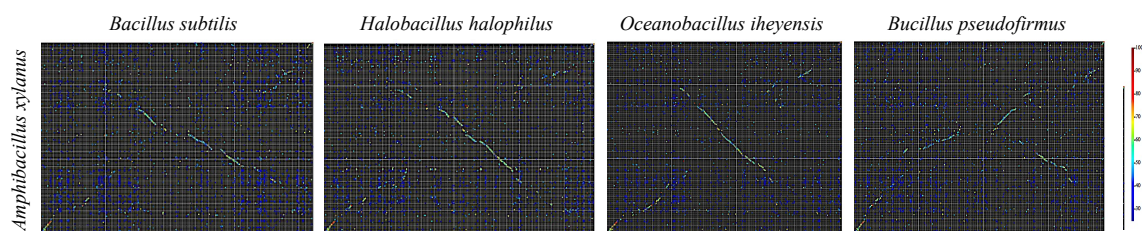


Figure 5-2-2. Synteny analysis of *Amphibacillus xylanus* between *Bacillus subtilis* 168, *Halobacillus halophilus* DSM2266, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 and *Bacillus pseudofirmus* OF4

第三項 遺伝子比較

1. ゲノムデータの取得

他菌種との遺伝子比較に必要なデータは KEGG, GenBank より得た。また、NITE 藤田信之氏、東洋大 藤波俊氏に協力頂き、オーソログ対応表を利用した。オーソログ対応表は以下の条件の下で作製されている。

- ・ゲノム対ゲノムで ORF 総当たりの blastp を行った時に双方向でベストヒットの関係にある。
- ・相同領域の長さがどちらの ORF に対して 70%以上ある。
- ・双方向で e-value が $1e-5$ 以下である。

以上のデータを用いて、比較菌株との遺伝子比較を行った。

2. *A. xylanus* に特異的な遺伝子群の解析

比較菌株に無く、*A. xylanus* にのみ存在する遺伝子を Table 5-2-4 にまとめた。キシラナーゼ遺伝子をはじめとする多糖分解酵素をコードする遺伝子、V-type ATPase の存在が見いだされた。

Table 5-2-4. Specific genes for *Amphibacillus xylanus*.

ORF ID	Product name		
AXY_00250	peptide ABC transporter ATP-binding protein	AXY_04130	sugar ABC transporter sugar-binding protein
AXY_00460	reverse transcriptase/maturase	AXY_04140	methyl-accepting chemotaxis protein
AXY_00680	polyprenyl diphosphate synthase	AXY_04600	acetyltransferase
AXY_00720	ApbE family protein	AXY_04770	two-component system response regulator
AXY_01940	single-stranded DNA-binding protein	AXY_05240	major facilitator superfamily transporter
AXY_02120	peptidase S14 family protein	AXY_05370	cellulase
AXY_02310	peptidase M23 family protein	AXY_05430	magnesium transporter MgtE
AXY_02490	MerR family transcriptional regulator	AXY_05440	PTS system beta-glucoside-specific enzyme
AXY_02500	MerR family transcriptional regulator	AXY_05450	6-phospho-beta-glucosidase
AXY_02640	reducing end xylose-releasing	AXY_05470	copper-responsive repressor CopY
AXY_02720	alpha-glucuronidase	AXY_05480	copper chaperone CopZ
AXY_02800	endo-1,4-beta-xylanase	AXY_05720	glutamate--cysteine ligase
AXY_02940	L-serine dehydratase	AXY_06490	meso-diaminopimelate D-dehydrogenase
AXY_03010	acetaldehyde/alcohol dehydrogenase	AXY_06550	two-component system response regulator
AXY_03070	signal peptidase I	AXY_06560	two-component system sensor histidine kinase
AXY_03260	phosphate ABC transporter ATP-binding	AXY_06950	cation-transporting ATPase
AXY_03570	carbamate kinase	AXY_07660	arabinoxylan arabinofuranohydrolase
AXY_04080	sugar ABC transporter ATP-binding protein	AXY_07770	alpha-xylosidase
AXY_04090	sugar ABC transporter permease protein	AXY_07790	xylosidase/arabinosidase
		AXY_08250	mannan endo-1,4-beta-mannosidase
		AXY_08320	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase

AXY_10030	type IV fimbrial assembly protein PilB	AXY_19610	peptide ABC transporter permease protein
AXY_10040	twitching mobility protein	AXY_19650	methyl-accepting chemotaxis protein
AXY_10050	type IV fimbrial assembly protein PilC	AXY_19680	ComK family protein
AXY_12250	spore cortex-lytic enzyme	AXY_20220	teichoic acid ABC transporter ATP-binding
AXY_12270	reverse transcriptase/maturase	AXY_20680	DNA-directed RNA polymerase subunit delta
AXY_12990	xylosidase/arabinosidase	AXY_20790	spore coat protein GerQ
AXY_13060	glutaredoxin-like protein NrdH	AXY_21020	NAD(P)H oxidoreductase
AXY_13230	V-type ATP synthase D subunit	AXY_21370	cation-transporting ATPase
AXY_13240	V-type ATP synthase B subunit	AXY_21570	cation-transporting ATPase
AXY_13250	V-type ATP synthase A subunit	AXY_21830	PTS system beta-glucoside-specific enzyme
AXY_13260	V-type ATP synthase G subunit	AXY_21860	mannose-6-phosphate isomerase
AXY_13270	V-type ATP synthase C subunit	AXY_21960	peptidase M23 family protein
AXY_13290	V-type ATP synthase K subunit	AXY_22090	endo-1,4-beta-xylanase
AXY_13300	V-type ATP synthase I subunit	AXY_22150	ribonucleotide reductase
AXY_13690	methyl-accepting chemotaxis protein	AXY_22210	oxidoreductase
AXY_13920	DNA polymerase I	AXY_22470	PTS system beta-glucoside-specific enzyme
AXY_13930	DNA polymerase I	AXY_22480	PTS system beta-glucoside-specific enzyme
AXY_13940	DNA polymerase I	AXY_22490	PTS system beta-glucoside-specific enzyme
AXY_14050	type II restriction enzyme	AXY_22510	6-phospho-beta-glucosidase
AXY_16360	peptidase S1 family protein	AXY_22580	6-phospho-beta-glucosidase
AXY_16820	F-type Na(+)-transporting ATPase subunit c	AXY_22590	methyl-accepting chemotaxis protein
AXY_17310	endo-1,4-beta-xylanase	AXY_22600	methyl-accepting chemotaxis protein
AXY_17320	endo-1,4-beta-xylanase	AXY_22610	methyl-accepting chemotaxis protein
AXY_17360	alkaline amylopullulanase	AXY_22620	glyoxal reductase
AXY_17570	xylosidase/arabinosidase	AXY_22830	xylosidase/arabinosidase
AXY_17930	peptide ABC transporter permease protein	AXY_22840	xylosidase/arabinosidase
AXY_17940	peptide ABC transporter permease protein	AXY_22860	beta-glucosidase
AXY_18270	preprotein translocase SecG subunit	AXY_22910	UDP-galactopyranose mutase
AXY_18280	phosphocarrier protein HPr	AXY_22990	major facilitator superfamily transporter
AXY_18460	small acid-soluble spore protein	AXY_23170	anaerobic ribonucleoside-triphosphate
AXY_18480	peptidase M15 family protein	AXY_23180	anaerobic ribonucleoside-triphosphate
AXY_18800	flagellin	AXY_23200	hydroxyacylglutathione hydrolase
AXY_19120	modification methylase	AXY_23320	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase
AXY_19360	ribose-phosphate pyrophosphokinase	AXY_23730	arabinoxylan arabinofuranohydrolase
AXY_19490	6-phosphofructokinase	AXY_23930	electron transport complex RnfD family
AXY_19580	beta-galactosidase	AXY_23940	electron transport complex RnfC family
AXY_19590	peptide ABC transporter ATP-binding protein		
AXY_19600	peptide ABC transporter permease protein		

3. *A. xylanus* が欠損した遺伝子群の解析

B. subtilis を基準とし、オーソログ比較を行い、*A. xylanus* のみ欠損した遺伝子を Table 5-2-5 にまとめる。

Table 5-2-5.

<i>B. subtilis</i> ORF ID	Product name		
BSU00120	inosine-monophosphate dehydrogenase	BSU03840	putative efflux transporter
BSU00140	deoxyadenosine/deoxycytidine kinase	BSU03900	4-aminobutyrate aminotransferase
BSU00150	deoxyguanosine kinase	BSU03910	succinate-semialdehyde dehydrogenase
BSU00170	putative isochorismatase	BSU03981	putative reductase or disulfide isomerase
BSU00270	putative decarboxylase	BSU03982	putative reductase or disulfide isomerase
BSU00450	conserved hypothetical protein	BSU03990	mannitol-1-phosphate dehydrogenase
BSU00460	conserved hypothetical protein	BSU04040	putative phosphatase
BSU00610	membrane protein of the forespore	BSU04050	putative phosphatase
BSU00750	cysteine synthase	BSU04070	conserved hypothetical protein
BSU01560	Mrp family regulator	BSU04080	conserved hypothetical protein
BSU01600	putative iron-chelator esterase	BSU04090	putative hydrolase subunit antagonist of
BSU01690	putative transcriptional regulator	BSU04100	transcriptional regulator (IcIR family)
BSU01700	putative transcriptional regulator	BSU04160	transcriptional regulator
BSU01710	putative acyltransferase	BSU04220	putative general stress protein
BSU01730	tRNA-Gln	BSU04340	putative enzyme with pyruvate as
BSU01740	anti-sigma(W) factor	BSU04360	manganese transporter
BSU02100	fatty acid beta-hydroxylating	BSU04380	conserved hypothetical protein
BSU02110	conserved hypothetical protein	BSU04440	C4-dicarboxylate binding protein
BSU02470	5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydratase	BSU04550	putative cation efflux system
BSU02640	alkaline phosphatase D	BSU04590	conserved hypothetical protein
BSU02650	pyrrolidone-carboxylate peptidase	BSU04600	conserved hypothetical protein
BSU02690	L-asparaginase 2 (putative lipoprotein)	BSU05330	hypothetical protein
BSU03000	glycine betaine ABC transporter	BSU05340	putative metal-anion antiporter protein
BSU03020	putative integral inner membrane protein	BSU05680	putative efflux transporter
BSU03050	L-lactate dehydrogenase	BSU05700	putative transcriptional regulator (GntR
BSU03090	putative aminoacid export permease	BSU05800	hypoxanthine efflux transporter
BSU03110	putative amino acid transporter	BSU06280	putative peroxidase
BSU03150	shikimate kinase	BSU06320	putative cation efflux transporter
BSU03160	putative methyltransferase	BSU06340	conserved hypothetical protein
BSU03200	proline oxidase	BSU06400	conserved hypothetical protein
BSU03210	1-pyrroline-5-carboxylate	BSU06560	putative adenine deaminase YerA
BSU03220	proline permease	BSU06710	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase
BSU03260	putative aromatic hydrocarbon hydrolase	BSU06880	putative oxidoreductase
BSU03470	positive regulator of hxlAB expression	BSU07350	putative aldehyde dehydrogenase
BSU03580	putative PLP-dependent transcriptional	BSU07450	putative oxidoreductase
BSU03620	cystine ABC transporter (permease)	BSU07550	heat stress induced protein
		BSU07570	2-oxoglutarate/malate transporter
		BSU07630	nitric-oxide synthase

BSU07750	putative aminoacid transporter	BSU10260	putative epimerase
BSU07850	general stress protein 18	BSU10270	long-chain fatty-acid-CoA ligase
BSU07955	putative mechanosensitive ion channel	BSU10750	putative catabolic enzyme
BSU08370	transcriptional regulator (TetR/AcrR	BSU10790	asparagine synthetase
BSU08480	putative oxidoreductase (nitroreductase	BSU10810	putative squalene/phytoene synthase
BSU08510	putative nucleotide binding protein	BSU10920	putative sulfate adenylyltransferase
BSU08530	conserved hypothetical protein	BSU11079	putative DNA/RNA binding protein
BSU08690	putative ABC transporter (ATP-binding	BSU11100	extracellular neutral protease B
BSU08710	putative membrane protein	BSU11230	N-acetylornithine aminotransferase
BSU08720	putative membrane protein	BSU11300	positive regulator of comK
BSU08740	putative membrane protein	BSU11490	putative exporter
BSU08750	conserved hypothetical protein	BSU11510	putative transporter component
BSU08760	sporulation-control gene	BSU11560	small regulatory RNA
BSU08780	putative peptidase	BSU11740	spore outer coat protein
BSU08880	alternative ribosomal protein S14	BSU11850	putative RNA ligase or phosphoesterase
BSU08970	serine protein kinase	BSU11860	putative hydrolase
BSU08980	serine protein kinase	BSU12230	putative enzyme
BSU09080	putative ABC transporter (ATP-binding	BSU12240	putative ABC transporter (permease)
BSU09090	putative ABC transporter (permease)	BSU12250	putative ABC transporter (permease)
BSU09180	conserved hypothetical protein	BSU12470	conserved hypothetical protein; PBSX
BSU09260	putative aminotransferase	BSU12500	PBSX phage protein, putative peptidase
BSU09270	putative aminotransferase	BSU12960	dipeptide ABC transporter
BSU09280	glycerol permease	BSU12970	muropeptide L,D-carboxypeptidase
BSU09380	NO-dependent activator of the ResDE	BSU13020	putative aminohydrolase
BSU09400	putative integral inner membrane protein	BSU13030	putative acyl-CoA hydrolase
BSU09410	alkaline phosphatase A	BSU13040	flavohemoglobin
BSU09420	alkaline phosphatase A	BSU13100	efflux transporter
BSU09450	putative NAD(P)-dependent	BSU13110	formyltetrahydrofolate hydrolase
BSU09490	putative acetyltransferase	BSU13150	peroxiredoxin
BSU09670	D-alanine aminotransferase	BSU13170	guanine deaminase
BSU09680	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	BSU13310	nitrogen sensing transcriptional
BSU09880	putative dehydratase	BSU13400	ATP-dependent DNA ligase subunit
BSU09889	conserved hypothetical protein	BSU13410	ATP-dependent DNA ligase subunit
BSU09965	putative bacteriocin	BSU13450	RNA polymerase sigma factor
BSU10060	putative hydrolase	BSU13520	conserved hypothetical protein
BSU10100	heme-degrading monooxygenase	BSU13570	ketoglutaramate omega-amidase
BSU10110	heme-degrading monooxygenase	BSU13580	methionine-glutamine aminotransferase
BSU10120	uroporphyrinogen III decarboxylase	BSU13710	putative transporter
BSU10130	ferrochelatase	BSU13720	pre-queuosine 0 synthase
BSU10140	ferrochelatase	BSU13740	7-carboxy-7-deazaguanine synthase
BSU10220	proton/sodium-glutamate symport	BSU13750	NADPH-dependent

BSU13860	putative Xaa-Pro dipeptidase	BSU17000	threonine 3-dehydrogenase
BSU13930	spore photoproduct (thymine dimer)	BSU17010	threonine 3-dehydrogenase
BSU13960	putative beta-hydroxyacid	BSU17280	putative peroxiredoxin-related protein
BSU14000	N-acetyl-L,L-diaminopimelate	BSU17440	putative C-S lyase
BSU14090	conserved hypothetical protein	BSU17450	transcriptional regulator (nitrogen
BSU14180	tetrahydrodipicolinate	BSU17460	glutamine synthetase
BSU14190	N-acetyl-diaminopimelate deacetylase	BSU17790	conserved hypothetical protein
BSU14230	thiol-disulfide isomerase	BSU17800	putative integral inner membrane protein
BSU14650	conserved hypothetical protein	BSU17830	putative integral inner membrane protein
BSU14660	conserved hypothetical protein	BSU17840	metallothiol transferase
BSU14820	conserved hypothetical protein	BSU17870	putative cell division protein
BSU14840	conserved hypothetical protein	BSU17950	putative integral inner membrane protein
BSU14860	pyruvate carboxylase	BSU17960	conserved hypothetical protein
BSU14880	protoheme IX farnesyltransferase 2	BSU17980	small acid-soluble spore protein
BSU14890	cytochrome caa3 oxidase (subunit II)	BSU18030	small acid-soluble spore protein
BSU14900	cytochrome caa3 oxidase (subunit I)	BSU18190	putative integral inner membrane protein
BSU14910	cytochrome caa3 oxidase (subunit III)	BSU18210	putative methylcrotonoyl-CoA
BSU14920	cytochrome caa3 oxidase (subunit IV)	BSU18220	putative Methylglutaconyl-CoA
BSU14930	cytochrome aa(3) assembly factor	BSU18230	putative hydroxymethylglutaryl-CoA
BSU14940	conserved hypothetical protein	BSU18239	acyl-CoA carboxylase; biotinylated
BSU15100	putative acetyltransferase	BSU18240	acyl-CoA carboxylase; biotinylated
BSU15120	malate glucosamine cysteine ligase	BSU18250	putative acetoacetyl-CoA synthetase
BSU15510	dihydroorotase	BSU18260	acyl-CoA dehydrogenase, short-chain
BSU15520	dihydroorotase	BSU18440	glutamate synthase (small subunit)
BSU15570	(phospho)adenosine phosphosulfate	BSU18450	glutamate synthase (large subunit)
BSU15610	adenylylsulfate kinase	BSU18500	putative oxido-reductase
BSU15620	sirohydrochlorin ferrochelata	BSU18530	putative N-acetyltransferase
BSU15630	Precorrin-2 dehydrogenase	BSU18620	putative
BSU15850	L-serine dehydratase (beta chain)	BSU18720	putative lipoprotein
BSU15860	L-serine dehydratase (alpha chain)	BSU18750	putative integral inner membrane protein
BSU16010	conserved hypothetical protein	BSU19140	putative integral inner membrane protein
BSU16090	succinyl-CoA synthetase (beta subunit)	BSU19150	conserved hypothetical protein
BSU16100	succinyl-CoA synthetase (alpha subunit)	BSU19170	putative carboxypeptidase
BSU16280	flagellar hook assembly protein	BSU19180	fatty acid desaturase
BSU16300	flagellar basal-body associated protein	BSU19190	two-component sensor histidine kinase
BSU16440	GTPase involved in the export of	BSU19200	two-component response regulator
BSU16700	putative sugar deacetylase	BSU19350	putative sodium-dependent transporter
BSU16790	protein export-enhancing factor	BSU19360	putative sodium-dependent transporter
BSU16800	spore DNA translocase	BSU19370	2-oxoglutarate dehydrogenase (E1
BSU16870	putative oxidoreductase	BSU19460	Component of the piezosome
BSU16880	conserved hypothetical protein	BSU19470	conserved hypothetical protein

BSU19480	putative integral inner membrane protein	BSU23920	putative propionyl-CoA carboxylase
BSU19730	putative aminoacyl-CoA-transferase	BSU23990	conserved hypothetical protein
BSU20490	putative SPbeta phage protein	BSU24000	putative lipid kinase BmrU
BSU21500	lesion bypass phage DNA polymerase	BSU24070	branched-chain fatty-acid kinase
BSU21510	conserved hypothetical protein; phage	BSU24080	branched-chain amino acid
BSU21550	putative acetyltransferase; phage SPbeta	BSU24100	transcriptional regulator
BSU21750	conserved hypothetical protein	BSU24150	short chain acyl-CoA dehydrogenase
BSU21880	putative lyase	BSU24160	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase
BSU21890	putative metal-dependent	BSU24530	protein octanoyltransferase
BSU21970	ribonuclease	BSU24550	putative sulfur transferase
BSU21980	putative integral membrane protein	BSU24560	putative sulfur transferase
BSU22010	5'3'-exonuclease	BSU24570	putative sulfur transferase
BSU22030	dynammin-like GTPase	BSU24610	master regulator of biofilm formation
BSU22040	alkylpyrone methyltransferase BpsB	BSU24620	major biofilm matrix component
BSU22050	promiscuous alkylpyrone synthase BpsA	BSU24630	type I signal peptidase
BSU22140	2-keto-3-deoxygluconate oxidoreductase	BSU24780	conserved hypothetical protein
BSU22460	tRNA nucleotidyltransferase	BSU24860	glucose kinase
BSU22510	putative integral inner membrane protein	BSU24870	membrane endopeptidase
BSU22540	putative integral inner membrane protein	BSU25010	putative efflux transporter
BSU22550	putative integral inner membrane protein	BSU25030	putative integral inner membrane protein
BSU22560	putative integral inner membrane protein	BSU25250	negative regulator of gluconeogenesis
BSU22570	conserved hypothetical protein	BSU25310	undecaprenol kinase
BSU22730	nucleoside diphosphate kinase	BSU25360	conserved hypothetical protein
BSU22750	menaquinone methyltransferase	BSU26490	putative integral inner membrane protein
BSU22810	putative lipoprotein	BSU26500	putative sulfur-carrier protein
BSU22849	conserved hypothetical protein	BSU26510	putative hydrolase
BSU22850	conserved hypothetical protein	BSU26530	putative rhodanese-related sulfur
BSU22940	spore cortex-lytic enzyme	BSU26540	conserved hypothetical protein
BSU22950	putative FAD-dependent disulfide	BSU26650	potassium/proton-divalent cation
BSU23130	factor required for cytochrome c	BSU26800	putative anionic nitroalkane dioxygenase
BSU23140	factor required for cytochrome c	BSU26940	putative lyase
BSU23150	factor required for cytochrome c	BSU27200	putative formate/nitrite transporter
BSU23328	conserved hypothetical protein	BSU27250	conserved hypothetical protein
BSU23430	stage V sporulation protein AB	BSU27260	conserved hypothetical protein
BSU23440	stage V sporulation protein AA	BSU27280	putative AdoMet-dependent
BSU23620	NADPH-dependent aldo-keto reductase	BSU27330	uridine kinase
BSU23660	conserved hypothetical protein	BSU27430	glutamine ABC transporter
BSU23750	putative lyase	BSU27490	putative tetratricopeptide repeat family
BSU23790	putative metal-dependent hydrolase	BSU27785	putative serine/threonine-protein kinase
BSU23810	putative N-deacylase	BSU28010	cell-shape determining protein
BSU23820	NADPH-dependent flavin	BSU28120	glutamate-1-semialdehyde

BSU28130	glutamate-1-semialdehyde	BSU29960	2'-5' RNA-ligase family protein
BSU28140	uroporphyrinogen III cosynthase	BSU29970	putative cysteine synthase-like protein
BSU28150	uroporphyrinogen III cosynthase	BSU30070	glycine betaine transporter
BSU28160	uroporphyrinogen III cosynthase	BSU30520	conserved hypothetical protein
BSU28170	glutamyl-tRNA reductase	BSU30560	phosphoenolpyruvate carboxykinase
BSU28420	conserved hypothetical protein	BSU30680	conserved hypothetical protein
BSU28430	succinate dehydrogenase (iron-sulfur	BSU30710	ribosomal protein L31
BSU28440	succinate dehydrogenase (flavoprotein	BSU30720	ribosomal protein L31
BSU28450	succinate dehydrogenase (flavoprotein	BSU30780	O-succinylbenzoate-CoA synthase
BSU28520	electron transfer flavoprotein (alpha	BSU30790	O-succinylbenzoic acid-CoA ligase
BSU28530	electron transfer flavoprotein (beta	BSU30800	dihydroxynaphthoic acid synthetase
BSU28540	enoyl-CoA hydratase	BSU30810	dihydroxynaphthoic acid synthetase
BSU28550	enoyl-CoA hydratase	BSU30820	dihydroxynaphthoic acid synthetase
BSU28560	long chain acyl-CoA ligase	BSU30830	menaquinone-specific isochorismate
BSU28570	putative integral inner membrane protein	BSU30940	glycogen phosphorylase
BSU28680	glycolate oxidase subunit	BSU30950	bacterial glycogen (starch) synthase
BSU28690	glycolate oxidase iron-sulfur subunit	BSU30960	bacterial glycogen (starch) synthase
BSU28730	arabinose/arabinan permease	BSU30970	bacterial glycogen (starch) synthase
BSU28830	conserved hypothetical protein	BSU30980	1,4-alpha-glucan branching enzyme
BSU28920	two-component response regulator	BSU31000	putative acetyl-transferase
BSU28930	two-component sensor histidine kinase	BSU31010	putative flotillin-like protein
BSU29010	S-adenosylmethionine decarboxylase	BSU31050	choline dehydrogenase
BSU29020	glyceraldehyde-3-phosphate	BSU31322	putative potassium channel protein
BSU29070	putative integral inner membrane protein	BSU31330	conserved hypothetical protein
BSU29120	malate dehydrogenase	BSU31370	putative NADH-dependent butanol
BSU29290	putative aminohydrolase	BSU31460	two-component sensor histidine kinase
BSU29410	putative metal-dependent hydrolase	BSU31540	lipoprotein involved in guanosine
BSU29440	argininosuccinate lyase	BSU31550	guanosine ABC transporter
BSU29450	argininosuccinate synthase	BSU31560	permease of ABC guanosine transporter
BSU29540	inorganic polyphosphate/ATP-NAD	BSU31570	permease of ABC guanosine transporter
BSU29550	putative metal-dependent hydrolase	BSU31600	putative bacteriocin
BSU29560	putative acyl-coenzyme A synthetase	BSU31610	Na ⁺ /H ⁺ antiporter complex
BSU29630	regulator of FtsZ	BSU31620	component of Na ⁺ /H ⁺ antiporter
BSU29680	acetyl-CoA synthetase	BSU31630	component of Na ⁺ /H ⁺ antiporter
BSU29690	protein acetyltransferase	BSU31640	non essential component of Na ⁺ /H ⁺
BSU29700	protein acetyltransferase	BSU31650	efflux transporter for Na ⁺ and cholate
BSU29710	protein deacetylase	BSU31760	nicotinamidase
BSU29870	conserved hypothetical protein	BSU31770	conserved hypothetical protein
BSU29890	putative metal-dependent hydrolase	BSU31830	putative metal-dependent
BSU29900	tRNA	BSU31920	putative transcriptional regulator
BSU29920	putative kinase/phosphotransferase	BSU32040	amino acid transporter

BSU32070	conserved hypothetical protein	BSU34890	amidotransferase (glutaminase)
BSU32080	conserved hypothetical protein	BSU34930	ATP phosphoribosyltransferase
BSU32170	diaminopimelate epimerase	BSU34980	putative integral inner membrane protein
BSU32200	putative NADH dehydrogenase	BSU35030	transcriptional regulator (GntR family)
BSU32210	putative NADH dehydrogenase	BSU35880	capsular polyglutamate synthetase
BSU32300	conserved hypothetical protein	BSU35890	capsular polyglutamate synthetase
BSU32330	lipoyl synthase (lipoic acid synthetase)	BSU35900	capsular polyglutamate synthetase
BSU32380	putative integral inner membrane protein	BSU36100	putative enzyme
BSU32420	allantoinase	BSU36120	putative anion transporter
BSU32520	xanthine dehydrogenase, FAD-binding	BSU36150	putative oxidoreductase
BSU32530	allantoate amidohydrolase	BSU36300	transcriptional regulator (DeoR family)
BSU32630	putative oxidoreductase	BSU36330	conserved hypothetical protein
BSU32719	conserved hypothetical protein	BSU36440	putative transcriptional regulator (MarR
BSU32770	conserved hypothetical protein	BSU36510	ammonium transporter
BSU32780	putative ribonuclease	BSU36600	transcriptional regulator (MerR family)
BSU32820	acyl-CoA dehydrogenase (FAD	BSU36880	ATP synthase (subunit i)
BSU32830	acetyl-CoA C-acyltransferase	BSU36910	conserved hypothetical protein
BSU32840	acetyl-CoA C-acyltransferase	BSU37090	putative fructose 1,6-bisphosphatase
BSU32940	conserved hypothetical protein	BSU37110	putative transaldolase
BSU33100	integral inner membrane protein	BSU37170	acyl-CoA dehydrogenase
BSU33110	integral inner membrane protein	BSU37180	putative iron-sulphur-binding reductase
BSU33190	putative oxidoreductase	BSU37220	putative oxidoreductase
BSU33290	putative ABC transporter component	BSU37340	conserved hypothetical protein
BSU33300	ferrichrome ABC transporter (permease)	BSU37490	agmatinase
BSU33310	ferrichrome ABC transporter (permease)	BSU37520	conserved hypothetical protein
BSU33430	sulfite reductase (hemoprotein	BSU37630	putative transporter
BSU33440	sulfite reductase (flavoprotein	BSU37670	phosphotransacetylase
BSU33470	thiol-disulfide oxidoreductase	BSU37830	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
BSU33510	copper transporter ATPase	BSU37930	conserved hypothetical protein
BSU33520	repressor of copper utilisation proteins	BSU38100	putative monooxygenase
BSU33890	putative acyltransferase	BSU38110	putative monooxygenase
BSU33980	putative alkanal monooxygenase	BSU38120	putative monooxygenase
BSU34180	putative transcriptional regulator (GntR	BSU38150	cytochrome aa3-600 quinol oxidase
BSU34200	RNA polymerase sigma-54 factor	BSU38160	cytochrome aa3-600 quinol oxidase
BSU34230	putative aminotransferase	BSU38170	cytochrome aa3-600 quinol oxidase
BSU34240	putative O-acetyltransferase	BSU38240	putative acetate Na ⁺ -dependent
BSU34250	putative O-acetyltransferase	BSU38620	hypothetical protein
BSU34430	amino acid racemase	BSU38740	NAD(P)H dehydratase
BSU34440	penicillin-binding protein 4*	BSU38970	putative dehydrogenase
BSU34640	conserved hypothetical protein	BSU38980	acetoacetyl CoA-transferase (subunit B)
BSU34820	conserved hypothetical protein	BSU39050	catalase 2

BSU39100	putative efflux transporter
BSU39240	putative transporter
BSU39370	imidazolone-5-propionate hydrolase
BSU39410	pyrimidine-nucleoside Na ⁺ (H ⁺)
BSU39610	putative integral inner membrane protein
BSU39760	methylmalonate-semialdehyde
BSU39970	putative integral inner membrane protein
BSU40022	putative murein hydrolase export
BSU40040	glycerate kinase
BSU40060	gluconate kinase
BSU40070	gluconate permease
BSU40190	fructose-1,6-bisphosphatase
BSU40340	ornithine aminotransferase
BSU40450	conserved hypothetical protein
BSU40630	inner spore coat protein
BSU40660	putative permease

4. 結果・考察

A. xylanus に見いだされる特徴として、呼吸鎖関与遺伝子群、Mrp コンプレックス、芽胞（もしくは細胞表層）関連遺伝子を欠損が挙げられる。呼吸鎖と Mrp コンプレックスはアルカリ耐性バチルス of アルカリ耐性機構に重要であるとの報告がある[62, 63]。これはプロトンの少ない環境下（アルカリ性下）での生存戦略の一つとして、プロトンの膜を隔てた電気化学的濃度勾配を Na^+ に置換し、機能を代替するメカニズムである。呼吸鎖を欠如した *A. xylanus* では Mrp コンプレックスは欠如しているが、ATP 依存性の Na^+ トランスポーターが多く存在していることから、*A. xylanus* のアルカリ適応機構は、呼吸鎖を有したバクテリア同様 Na^+ の膜を隔てた電気化学的濃度勾配が重要であることが推察される。過去の研究に於いて、*A. xylanus* より V-type ATPase の精製が報告[64]されており、機能的な発現が支持されることから、本仮説に興味を持たれる。加えて、本参考文献では、*A. xylanus* の細胞内 pH はドナン効果により、外環境と比べて pH unit で-1.6 程度低いと考察している。以上より、本菌のアルカリ適応機構、細胞内 pH は *Bacillus* 属細菌と変わらないことが推察される。

総括

我々の研究室では、農産廃棄物の低コスト有効利用系の確立を目指したバクテリアのスクリーニングから、新属新種 *Amphibacillus xylanus* (以下、*A. xylanus*) を単離・命名した[2]。同菌は呼吸鎖のみならず既知の catalase や peroxidase を欠如するが、呼吸鎖を有する大腸菌と同等な酸素吸収能を有し、嫌気・好気条件下で同等の生育速度と細胞収量を示す[59]。この生育特性はバイオマス利用に有効と期待される。本研究の目的は、酸素吸収を生み出す *A. xylanus* の好気代謝系の解明である。同研究室では、代謝産物、酵素活性、プロテオーム解析から好気代謝に関与すると推定される酵素を見いだしてきたが[4, 59]、好気代謝系における局所的な推定に留まっていた。そこで独立行政法人 NITE との共同研究「*Amphibacillus xylanus* のゲノム解析」が開始され、2012 年、全遺伝子のマニュアルアノテーションが完成した。

本研究では、まずゲノムデータベースを用いた *A. xylanus* の好気代謝系と、関連代謝系の検討を行った。この結果を基に、酸素代謝系に焦点を絞り、酸素代謝酵素の探索と解析、さらには生化学的手法の併用による代謝系探索を試みた。

第一章では *A. xylanus* ゲノムデータベースを基に Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway から遺伝子のマッピングを行い、*A. xylanus* の糖代謝、アミノ酸合成経路、核酸代謝経路、脂肪酸代謝経路の存在をゲノムレベルで明らかにした。

好気、嫌気の各条件下で定常的に培養した菌体より mRNA を調製し、ゲノム解析から見いだした各代謝系酵素遺伝子の RNA-seq 解析を行い、各代謝経路酵素遺伝子の転写を確認した。呼吸鎖を欠如した *A. xylanus* において、糖代謝 (解糖系、ピルビン酸代謝)系は主要なエネルギー生産系として重要である。そこで同代謝系に属する各酵素遺伝子の転写をノーザン解析により確認した。本解析により、生化学的なデータから推定された好気代謝系酵素遺伝子群に加え、基幹代謝経路関与遺伝子が存在し、転写されることが明らかになった。

我々の研究室では生化学的実験より本菌の好気代謝における NADH oxidase (Nox) -peroxiredoxin (Prx) complex, Pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, SOD の寄与を報告し、これらの酵素遺伝子 (*nox1*, *prx*, *pdh* operon, *sodA*)の酸素ストレス下での転写誘導を見いだした[5]。ゲノム解析により更に 7つの酸素代謝関連酵素遺伝子 (*dps*, *fer*, *fdxA*, *nox2*, *trxA*, *trxB*, *yumC*) の存在を明らかにし、ノーザン解析から、*fer*, *fdxA*, *trxA*, *trxB*, *yumC* の酸素による転写誘導を見いだした。*nox2* 水生成型の NADH oxidase とアノテーションされており、酸素代謝への関与が推察されるが、好気条件下での電圧誘導が見られないことに加えて、過去の NADH oxidase の精製実験において、*A. xylanus* の主要な NADH oxidase 活性は過酸化水素生成型の Nox (*nox1*)であることが見いだされており、本菌の酸素代謝への寄与は少ないことが推定される。

また、Manganese catalase 遺伝子の存在も見いだされたが、過去の研究でカタラーゼ活性が検出さず、今回のノーザン解析の結果、明確なバンドを検出出来なかった為、本遺伝子は機能的ではないと推定している。酸素代謝関与遺伝子の更なる検索と解析を目的として、嫌気培養時に酸素を添加し、経時的 (0, 5, 10, 30 min) に調製した mRNA サンプルを、RNA-seq 解析へ供した。得られたデータを基に、転写パターンによる全遺伝子のクラスタリング (Euclidean distance, Average linkage) を検討した。その結果、興味深いことに生化学的に好気代謝への関与が示唆される遺伝子 (*pdhBCD nox1, prx, sodA*) は、近接するクラスターを形成することが明らかとなった。本クラスター内に分類された遺伝子がどのように本菌の好気代謝に寄与し得るのか興味を持たれたが、このクラスター内に酸素代謝への関与報告のある遺伝子は見いだせなかった。

本菌の Nox は生化学的にも遺伝子転写レベルでも酸素代謝への関与が示唆された酵素である[4]。しかし、Nox の酸素への親和性は低く、遊離フラビン添加で初めて酸素への親和性が上昇した[21]。そこで次章では、遊離フラビンとその関与する酸素代謝酵素の存在を生化学的な手法で検討した。

フラビンは一般にタンパク質と結合した形で存在し、機能するとされており、非タンパク質結合性フラビン (遊離フラビン) の細胞内での存在と機能は不明であった。しかし近年の研究において、遊離フラビンが関与した酵素反応が報告されつつある[16-20]。超音波法による *A. xylanus* 細胞破碎液から、ゲル濾過により遊離フラビンが分離され、細胞内遊離フラビンの存在が報告された[22]。ゲル濾過法は、遊離フラビンを分離し、蛋白質結合フラビンとの差異証明に適しているが、カラム担体への遊離フラビン吸着から、定量性に問題があった。

そこで第二章では、膜遠心フィルターによる遊離フラビンの分離を検討した。フラビンのフィルターへの吸着が 5 %以下の遠心メンブレンを見いだし、30 kDa cut off、3 kDa cut off メンブレンフィルターの併用により、タンパク質と遊離フラビンの定量的な分離が可能となった。なお前法では、超音波法による細胞破碎を行ったが、細胞破碎時に遊離フラビンがタンパク質結合フラビンから離脱する可能性があった。そこで、超音波破碎の他に、フレンチプレス、マルチビーズショッカーを用いた細胞破碎法を比較検討した。各破碎法により得られたサンプルの、顕微鏡観察、タンパク量、酵素活性 (NADH oxidase 活性) と確立した遊離フラビン測定の結果に基づき、破碎効率を評価した。その結果、French Press, 3 回処理による細胞破碎が遊離フラビンの調製に最も適していた。

10 L ジャーファメンターを用いて、酸素濃度 0, 10, 21, 40 %条件下で培養し、得られた菌体から、細胞内遊離フラビンを分離、定量した。湿菌体、乾燥菌体の重量差から細胞内水分含量を推定し、21 %酸素存在下での遊離 FAD 濃度は約 8 μ M と

算出された。なお嫌気条件下 (0% O₂) と比較して、酸素存在下(10, 21, 40 % O₂)で遊離フラビン含量は増加した。本実験結果は細胞内遊離フラビンの存在を支持する初の結果と言える。

第三章では、第二章の解析の結果明らかとなった生理的な細胞内遊離フラビン濃度下で酸素代謝活性を示す酵素の生成と機能解析を行った。細胞内遊離フラビン近傍濃度として 10 μM FAD 存在下での NADH oxidase 活性を指標に、遊離フラビン関与する酸素代謝酵素の精製を試みた。今回、1st カラム (Butyl TOYOPEARL 650S) による分画で Nox を含む活性画分と Nox を含まない活性画分を得た。後者の画分を更に DEAE Sephacel, POROS HQ/10 カラムにより精製した。遺伝子配列から推定した精製酵素の全アミノ酸配列の BLAST 解析の結果、本酵素は *Bacillus cereus* G9241 の nitro reductase family protein と 66 %の相同性を示す機能未知の酵素であった。精製酵素を便宜上 NAD (P) H oxidoreductase (NPO)と仮称した。

NPO の更なる機能解析のために大腸菌での発現系を構築し、精製した recombinant NPO を用いて酵素学的な諸性質を解析した。本酵素は nitro reductase family protein と相同性を示すが、同酵素の代表基質であるニトロフラゾンに対する活性は低く、8 μM FAD 存在下で過酸化水素生成型の NADH oxidase 活性を示した。

細胞内遊離フラビンの定量分析に使用した菌体を用いて、NPO、Nox、Prx のノーザン解析、ウェスタン解析を試みた。その結果、NPO は Nox や Prx と同様に、酸素存在下で転写、タンパク発現ともに誘導された。これに加え、細胞内遊離フラビン量が酸素存在下で増加し、その生合成系遺伝子転写の促進が観察されることから、*A. xylanus* の好気代謝経路における遊離フラビンが関与する酸素代謝系の機能的発現が強く示唆された (Figure 1)。

NPO の酸素に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m)は、 $3.0 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}\text{M}^{-1}$ であり、8 μM FAD 存在下では $2.9 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}\text{M}^{-1}$ であった。これは、遊離フラビン非存在下の触媒効率が 100 倍に活性化されることを意味する。一方、8 μM FAD 存在下における Nox の酸素に対する触媒効率は $4.3 \times 10^5 \text{ sec}^{-1}\text{M}^{-1}$ であり、酸素に対する触媒効率は NPO よりも Nox の方が約 15 倍高かった。先の精製における 1st カラム画分の活性比較においても、Nox 含有画分の方が NPO 含有画分よりも高い活性を示した。これより、酵素学的な酸素代謝活性の観点から、遊離フラビン存在下での酸素代謝活性は NPO よりも Nox の方が高いことが示唆された。これまでの解析の結果、*A. xylanus* の過酸化水素分解酵素系は Nox-Prx のみである。したがって、本菌の酸素代謝、過酸化水素分解の要酵素系は Nox-Prx であると考察し、次章では、Nox-Prx 系の更なる解析を試みた。

Nox-Prx の過酸化水素分解速度は、 $150 \sim 180 \text{ sec}^{-1}$ であり、この値は Nox に結合する FAD の NADH による還元速度 (200 sec^{-1}) に近い値である[65]。従って、本酵素系

の過酸化水素分解速度は本酵素系が触媒できる限界の速度と推定された。本酵素反応は Nox から Prx に各々の Cys 残基を通じて電子が伝達される。この電子伝達の効率化には、Nox, Prx がより接近する複合体形成が有利と考えられた。複合体形成を示唆する結果が得られたが、複合体分子量の決定とその構造の推定には至らなかった。そこで第四章では、複合体分子量と構造に着目し、その解析を試みた。

分析的超遠心解析による複合体分子量測定を試みたが、分子量算出には至らなかった。そこで、本実験では静的光散乱法を試みた。この解析手法は生体高分子の分子量を極めてマイルドな条件下で、非破壊的に測定でき、ターゲットタンパク質分子量の絶対定量が可能である。解析には Calypso と MALS detector (Wyatt 社)を用いた。結果、Nox-Prx は複合体を形成し、複合体形成時の Nox と Prx の分子量はそれぞれ 105.9、201.7 kDa、及び解離定数は $K_D = 7.08 \times 10^{-6} \text{ M}$ と算出された。これは、Nox が二量体 (dimer)、Prx が十量体 (decamer) オリゴマーをそれぞれ形成し、更にそれらが高次の複合体を緩く形成することを示唆した。更に、両オリゴマーの結合比を Nox (dimer) : Prx (decamer) = 2 : 1 としたときに最も良いフィッティング結果が得られた。

Prx, Nox それぞれの結晶構造解析に成功したが[28](Kitano 2013, data not shown)、複合体立体構造解析には至っていない。そこで非結晶構造解析手法である BioSAXS を用いて、Nox、Prx および Nox-Prx 複合体の立体構造解析を試みた。その結果、BioSAXS により得られた Nox と Prx のビーズモデルはそれぞれの結晶構造と一致した。更に、Nox-Prx 複合体構造のビーズモデルも得ることに初めて成功し、現在得られた立体構造の結晶構造のフィッティングを試みている。

これまでの解析により、*A. xylophilus* 酸素代謝において、Nox-Prx は要となる酵素系であることが推定された。第五章ではこの Nox-Prx のバクテリア界における分布を検討した。Nox は AhpF とペルオキシレドキシシンレダクターゼスーパーファミリーを形成することから、本章では、Nox, AhpF-Prx の微生物界に於ける分布を生化学的な文献とゲノムデータベースを基に調べた。バクテリア界を大きく四分類 (絶対好気性、通性嫌気性、酸素耐性、絶対嫌気性)し、菌種を選定した。その結果、本酵素系は好気性菌から嫌気性菌まで広く分布し、Nox, AhpF のアミノ酸配列より作製した系統進化樹を 16S rRNA の系統樹と比較したところ、全供試菌を含む二つの系統樹は高い相関性を示した。

以上をまとめると、本研究により *A. xylophilus* の好気代謝系と、その関連する基幹代謝系を遺伝子の転写レベルで明らかにし、生化学的手法との併用から、遊離フラビンが関与する酸素代謝系を見いだした。以上の結果に基づき、*A. xylophilus* 好気代謝系ここに提唱し (Figure 1)、以下の三項目が考察される。

1. 酸素代謝の要となる Nox-Prx 系は複合体形成し、この複合体の緩い結合が高速反応を可能にすると推察されるが、この仮説の解明には更なる立体構造と反応機構との相関解析が必要である。
2. 本菌の大腸菌 (呼吸鎖)に匹敵する酸素吸収能も未解明であり、これらの解明には、遺伝子操作系の確立が不可欠であるが、安定的な外来遺伝子の *A. xyloxy* への導入法の開発は容易ではない。その代替として、現在突然変異を利用した変異株と野生株との比較解析が行なわれており、その成果が期待される。
3. Nox, AhpF-Prx 系はバクテリア界に広く分布し、Nox, AhpF の系統進化樹と 16S rRNA の系統樹との間の高い相関性は、“酸素が生物進化に影響を与えた” という説を、支持する結果 と思われる。加えて、本解析より見いだされた遊離フラビン反応系の一般細菌における知見の蓄積され、その生理学的意義の解明が望まれる。

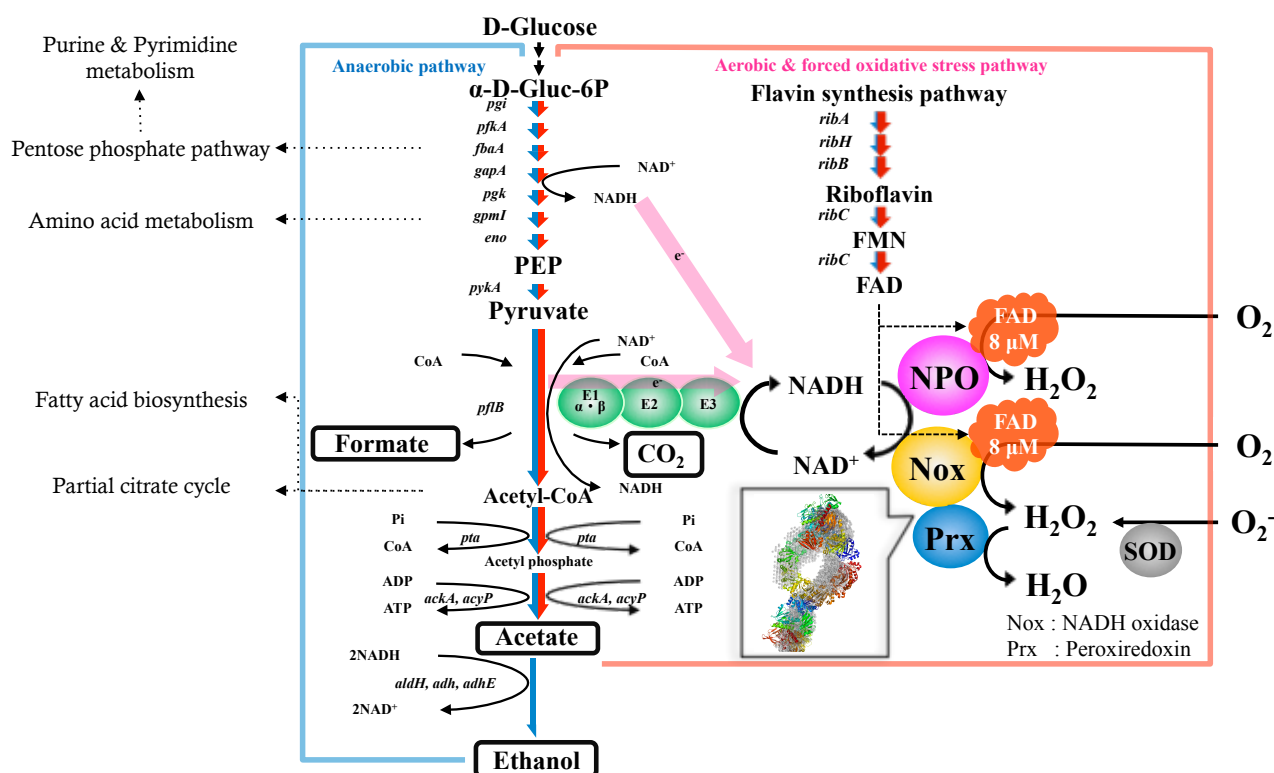


Figure 1. 本研究により提唱された *Amphibacillus xyloxy* 好気代謝経路図。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり直接ご指導を賜りました、東京農業大学教授新村洋一先生、准教授川崎信治先生、助教授佐藤純一先生に深く感謝致します。本研究の遂行のみならず、論文作製に関して多大にご指導を賜りました東京農業大学教授・中川純一先生、札幌医科大学阿部晃先生に深く感謝致します。*A. xylophilus* のゲノム解析を行うにあたり、多大な御協力を賜りました独立行政法人製品評価技術基盤機構の藤田信之先生、ならびに藤波俊先生 (現東洋大学) に深く感謝いたします。トランスクリプトーム解析に当たり、技術的な指導ご助言賜りました、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの志波優様 (現岩手医科大学)、石毛太一郎様、八田真理様に深く感謝致します。Nox-Prx 系の複合体解析を遂行するにあたり、ご助言、ご協力を頂きました東京工業大学・有坂文雄先生、金丸周司先生ならびに NIH Dr. Allen P. Minton に深く感謝します。Nox-Prx 結晶構造解析にあたり、多大なご協力頂きました、奈良先端大学院大学 北野健准教授に深く感謝致します。Nox-Prx 構造解析を行うに当たり、技術指導、解析を行って頂きました、(株)Rigaku 林真人様、松本崇様に深く感謝致します。10L ジャーファメンターを用いた培養にあたり、機器メンテナンス、技術指導賜りました、(株)丸菱バイオエンジニアリング岩崎晴彦様に深く感謝致します。Nox-Prx バクテリア界に於ける分布解析を行うにあたり、ご助言、御協力頂きました、東京農業大学 石川森夫先生、田中尚人先生に深く感謝致します。本研究の遂行にあたり有益な御助言と直接の御指導をして頂きました平成 19 年度卒業、柿沼俊先輩、立見真也先輩、平成 20 年度修了・新井俊晃先輩、佐藤拓海先輩、田中理一郎先輩、平成 21 年度修了笹倉夏樹先輩に深く感謝致します。本研究の推敲にあたり苦楽を共にした、森田円史君、田中遥さん、西田俊介君、川畑愛美さん、木俣真弥君、川村友亮君、富塚俊君、原敬太君に深く感謝します。

最後に、東京農業大学 資源生物工学研究室というすばらしい環境に身をおく機会を与えてくれた両親と兄妹、6 年に渡る研究生生活を公私含めて支えてくれた妻 光穂子に心から感謝致します。

平成 25 年度 3 月 1 日

望月 大地

参考文献

1. Niimura, Y., et al., *A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone, and catalase*. Agric. Biol. Chem., 1987. **51**(8): p. 2271-2275.
2. Niimura, Y., et al., *Amphibacillus xylanus* gen-nov, sp-nov, a facultatively anaerobic spore-forming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. Int. J. Syst. Bacteriol., 1990. **40**(3): p. 5.
3. Ishikawa, M., et al., *Paraliobacillus ryukyuensis* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive, slightly halophilic, extremely halotolerant, facultative anaerobe isolated from a decomposing marine alga. J. Gen. Appl. Microbiol., 2002. **48**(5): p. 269-79.
4. Arai, T., *Amphibacillus xylanus* の酸化ストレス防御機構に関する研究, in Biosciense. 2009, Tokyo University of agriculture.
5. Mochizuki, D., et al., *Adaptive response of Amphibacillus xylanus to normal aerobic and forced oxidative stress conditions*. Microbiology, 2014. **160**(Pt 2): p. 340-52.
6. Sasakura, N., *Amphibacillus xylanus* の好気代謝経路に関する研究, in Biosciense. 2010, Tokyo University of agriculture: Tokyo.
7. Kawasaki, S., et al., *Identification of O₂-induced peptides in an obligatory anaerobe, Clostridium acetobutylicum*. FEBS Lett., 2004. **571**(1-3): p. 21-5.
8. Schroeder, A., et al., *The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Molecular Biology, 2006. **7**.
9. Imbeaud, S., et al., *Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(6): p. 1-12.
10. Saarelainen, R., et al., *Cloning, sequencing and enhanced expression of the Trichoderma reesei endoxylanase II (pI 9) gene xln2*. Mol Gen Genet, 1993. **241**(5-6): p. 497-503.
11. Sintchak, M.D., et al., *The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer*. Nature Structural Biology, 2002. **9**(4): p. 293-300.
12. Nilsson, D., et al., *A Lactococcus lactis gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential Escherichia coli ftsH gene product*. Microbiology, 1994. **140** (Pt 10): p. 2601-10.
13. Suh, J.W., et al., *Isolation of a secY homologue from Bacillus subtilis: evidence for a*

- common protein export pathway in eubacteria*. Mol Microbiol, 1990. **4**(2): p. 305-14.
14. Reizer, J., et al., *Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system*. Protein Sci, 1993. **2**(4): p. 506-21.
 15. Reizer, J., et al., *Functional interactions between proteins of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase systems of Bacillus subtilis and Escherichia coli*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9158-69.
 16. Nijvipakul, S., et al., *LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence*. Journal of Bacteriology, 2008. **190**(5): p. 1531-1538.
 17. Suadee, C., et al., *Luciferase from Vibrio campbellii is more thermostable and binds reduced FMN better than its homologues*. Journal of Biochemistry, 2007. **142**(4): p. 539-552.
 18. Campbell, Z.T. and T.O. Baldwin, *Fre is the major flavin reductase supporting bioluminescence from Vibrio harveyi luciferase in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(13): p. 8322-8328.
 19. Sirivech, S., E. Frieden, and S. Osaki, *The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins*. Biochemical Journal, 1974. **143**(2): p. 311-315.
 20. Sato, J., et al., *Synechocystis ferredoxin-NADP + oxidoreductase is capable of functioning as ferric reductase and of driving the Fenton reaction in the absence or presence of free flavin*. BioMetals, 2011. **24**(2): p. 311-321.
 21. Nishiyama, Y., et al., *Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria*. J. Bacteriol., 2001. **183**(8): p. 2431-8.
 22. Ohnishi, K., et al., *Purification and analysis of a flavoprotein functional as NADH oxidase from Amphibacillus xylanus overexpressed in Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(50): p. 31418-23.
 23. Mochizuki, D., *Amphibacillus xylanus の補因子とその代謝系に関する研究*, in Bioscience. 2011, Tokyo University of Agriculture: Tokyo.
 24. Kimata, S., *Amphibacillus xylanus の酸素代謝に関する研究*, in Bioscience. 2013, Tokyo University of Agriculture: JPN.
 25. Zenno, S., et al., *Biochemical characterization of NfsA, the Escherichia coli major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a Vibrio harveyi flavin oxidoreductase*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**(15): p. 4508-4514.
 26. Niimura, Y., *The NADH oxidase-Prx system in Amphibacillus xylanus*. Subcell Biochem, 2007. **44**: p. 195-205.

27. Kitano, K., et al., *Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus*. J Biochem, 1999. **126**(2): p. 313-9.
28. Kitano, K., et al., *Crystal structure of decameric peroxiredoxin (AhpC) from Amphibacillus xylanus*. Proteins, 2005. **59**(3): p. 644-7.
29. Jacobson, F.S., et al., *An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(3): p. 1488-96.
30. Niimura, Y., L.B. Poole, and V. Massey, *Amphibacillus xylanus NADH oxidase and Salmonella typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of S. typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(43): p. 25645-50.
31. Schonbaum, G.R. and B. Chance, *CATALASE*. Boyer, Paul D. (Ed.). the Enzymes, Vol. Xiii. Oxidation-Reduction, Part C. Dehydrogenases (Ii), Oxidases (Ii), Hydrogen Peroxide Cleavage. 3rd. Ed. Xxv+542p. Illus. Academic Press: New York, N.Y., U.S.a.; London, England. Isbn 0-12-122713-8, 1976: p. 363-408.
32. Kono, Y. and I. Fridovich, *Isolation and characterization of the pseudocatalase of Lactobacillus plantarum*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(10): p. 6015-6019.
33. Antelmann, H., et al., *General and oxidative stress responses in Bacillus subtilis: Cloning, expression, and mutation of the alkyl hydroperoxide reductase operon*. Journal of Bacteriology, 1996. **178**(22): p. 6571-6578.
34. Mongkolsuk, S., et al., *Characterization of transcription organization and analysis of unique expression patterns of an alkyl hydroperoxide reductase C gene (ahpC) and the peroxide regulator operon ahpF-oxrR-oxrX from Xanthomonas campestris pv phaseoli*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(12): p. 3950-3955.
35. Seaver, L.C. and J.A. Imlay, *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(24): p. 7173-7181.
36. Arai, T., et al., *Taxonomical and physiological comparisons of the three species of the genus Amphibacillus*. Journal of General and Applied Microbiology, 2009. **55**(2): p. 155-162.
37. Hansson, L. and M.H. Haggstrom, *Effects of growth conditions on the activities of superoxide dismutase and NADH oxidase NADH peroxidase in streptococcus lactis*.

- Current Microbiology, 1984. **10**(6): p. 345-352.
38. Jiang, R., B.R. Riebel, and A.S. Bommarius, *Comparison of alkyl hydroperoxide reductase (AhpR) and water-forming NADH oxidase from Lactococcus lactis ATCC 19435*. Advanced Synthesis and Catalysis, 2005. **347**(7-8): p. 1139-1146.
 39. Nishiyama, Y., et al., *Purification and characterization of Sporolactobacillus inulinus NADH oxidase and its physiological role in aerobic metabolism of the bacterium*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. **84**(1): p. 22-27.
 40. Lechardeur, D., et al., *The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase C binds heme and participates in its intracellular availability in Streptococcus agalactiae*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(21): p. 16032-16041.
 41. Higuchi, M., et al., *Identification of 2 distinct NADH oxidases corresponding to H₂O₂-forming oxidase and H₂O-forming oxidase induced in Streptococcus mutans*. Journal of General Microbiology, 1993. **139**: p. 2343-2351.
 42. Poole, L.B., et al., *AhpF and other NADH : peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M (r) thioredoxin reductase*. Eur. J. Biochem., 2000. **267**(20): p. 6126-6133.
 43. Poole, L.B. and A. Claiborne, *Interactions of pyridine nucleotides with redox forms of the flavin-containing NADH peroxidase from Streptococcus faecalis*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(31): p. 14525-14533.
 44. Schmidt, H.L., et al., *Isolation and properties of a water-forming NADH oxidase from Streptococcus faecalis*. European Journal of Biochemistry, 1986. **156**(1): p. 149-156.
 45. Hummel, W. and B. Riebel, *Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from Lactobacillus brevis*. Biotechnology Letters, 2003. **25**(1): p. 51-54.
 46. Murphy, M.G. and S. Condon, *Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in Lactobacillus plantarum cultures*. Arch. Microbiol., 1984. **138**(1): p. 44-8.
 47. Park, J.T., et al., *NAD(P)H oxidase V from Lactobacillus plantarum (NoxV) displays enhanced operational stability even in absence of reducing agents*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, 2011. **71**(3-4): p. 159-165.
 48. Riebel, B.R., et al., *Cofactor regeneration of both NAD(+) from NADH and NADP(+) from NADPH : NADH oxidase from Lactobacillus sanfranciscensis*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2003. **345**(6-7): p. 707-712.
 49. Koike, K., et al., *Purification and characterization of NADH oxidase from a strain of Leuconostoc mesenteroides*. Journal of Biochemistry (Tokyo), 1985. **97**(5): p.

- 1279-1288.
50. Rocha, E.R. and C.J. Smith, *Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe Bacteroides fragilis*. Journal of Bacteriology, 1999. **181**(18): p. 5701-5710.
 51. Diaz, P.I., et al., *Studies on NADH oxidase and alkyl hydroperoxide reductase produced by Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiology and Immunology, 2004. **19**(3): p. 137-143.
 52. Diaz, P.I. and A.H. Rogers, *The effect of oxygen on the growth and physiology of Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiology and Immunology, 2004. **19**(2): p. 88-94.
 53. Shimamura, S., et al., *Relationship between oxygen sensitivity and oxygen-metabolism of Bifidobacterium species*. Journal of Dairy Science, 1992. **75**(12): p. 3296-3306.
 54. Talwalkar, A. and K. Kailasapathy, *The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to L. acidophilus and Bifidobacterium spp.* Current issues in intestinal microbiology, 2004. **5**(1): p. 1-8.
 55. Kawasaki, S., et al., *An O₂ inducible rubrerythrin-like protein, rubperoxin, is functional as a H₂O₂ reductase in an obligatory anaerobe Clostridium acetobutylicum*. Febs Letters, 2007. **581**(13): p. 2460-2464.
 56. Kawasaki, S., et al., *O₂ and Reactive Oxygen Species Detoxification Complex, Composed of O₂-Responsive NADH:Rubredoxin Oxidoreductase-Flavoprotein A2-Desulfoferrodoxin Operon Enzymes, Rubperoxin, and Rubredoxin, in Clostridium acetobutylicum*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. **75**(4): p. 1021-1029.
 57. Chen, L., et al., *Rubredoxin oxidase, a new flavo-hemo-protein, is the site of oxygen reduction to water by the strict anaerobe Desulfovibrio gigas*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **193**(1): p. 100-105.
 58. Chen, L., et al., *Purification and characterization of an NADH rubredoxin oxidoreductase involved in the utilization of oxygen by desulfovibrio gigas*. European Journal of Biochemistry, 1993. **216**(2): p. 443-448.
 59. Niimura, Y., et al., *Aerobic and anaerobic metabolism in a facultative anaerobe Ep01 lacking cytochrome, quinone and catalase*. FEMS Microbiol. Lett., 1989. **61**(1-2): p. 6.
 60. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-2948.
 61. Tamura, K., et al., *MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum*

- likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Molecular Biology and Evolution, 2011. **28**(10): p. 2731-2739.
62. Fujinami, S., et al., *Na⁺ and flagella-dependent swimming of alkaliphilic Bacillus pseudofirmus OF4: A basis for poor motility at low pH and enhancement in viscous media in an "up-motile" variant*. Archives of Microbiology, 2007. **187**(3): p. 239-247.
63. Fujinami, S., et al., *The voltage-gated Na⁺ channel NaVBP co-localizes with methyl-accepting chemotaxis protein at cell poles of alkaliphilic Bacillus pseudofirmus OF4*. Microbiology, 2007. **153**(12): p. 4027-4038.
64. Koyama, N., Y. Niimura, and M. Kozaki, *Bioenergetic properties of a facultatively anaerobic alkalophile*. FEMS Microbiol. Lett., 1988. **49**(1): p. 123-126.
65. Niimura, Y. and V. Massey, *Reaction mechanism of Amphibacillus xylanus NADH oxidase/alkyl hydroperoxide reductase flavoprotein*. J. Biol. Chem., 1996. **271**(48): p. 30459-64.